



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Mecanismos moleculares de desregulación de la proteína
SET y estudio de su valor pronóstico y terapéutico en
cáncer colorrectal**

Blanca Torrejón Moreno

Madrid, 2019.



Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Mecanismos moleculares de desregulación de la proteína
SET y estudio de su valor pronóstico y terapéutico en
cáncer colorrectal**

Memoria presentada por Dña. Blanca Torrejón Moreno,
Licenciada en Ciencias Químicas.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Ion
Cristóbal y el Prof. Jesús García-Foncillas

Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz

D. Ion Cristóbal Yoldi, Doctor en Bioquímica por la Universidad de Navarra e investigador del Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz

y

D. Jesús García-Foncillas López, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, director del Oncohealth Institute y Profesor titular de la Universidad Autónoma de Madrid

certifican:

que Blanca Torrejón Moreno ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado “Mecanismos moleculares de desregulación de la proteína SET y estudio de su valor pronóstico y terapéutico en cáncer colorrectal”

para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares.

Dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por tanto, avalamos su presentación para ser juzgado.

Para que conste, firmamos el presente certificado en:

Madrid, a 20 de Marzo de 2019

Dr. Ion Cristóbal Yoldi

Prof. Jesús García-Foncillas López

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé que llegaría este momento... cuando terminé la Licenciatura pensé que mis estudios acabarían aquí, sin embargo casi seis años después, aquí estoy defendiendo una tesis doctoral. En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres todo lo que han hecho por mí siempre y decirles que si he llegado hasta aquí ha sido gracias a ellos, tanto a nivel económico como sentimental. Ellos han sido un apoyo fundamental en toda esta etapa y han sabido motivarme enormemente en esos momentos en los que he querido tirar la toalla. Espero que os sintáis la mitad de orgullosos de lo que yo me siento de vosotros.

También me gustaría dar las gracias a mi abuela Flores, que en paz descanse, por haber sido otro pilar importante en esta etapa, ya que con ella empecé a vivir esta experiencia. Sus consejos y sus riñas en la convivencia día a día me han hecho crecer mucho como persona. Te echo mucho de menos abuela y me hubiese encantado que hubieras podido estar presente para ver en lo que me he convertido.

Mil millones de gracias a Ion. Sin ti nada de esto habría sido posible; te agradezco enormemente todo lo que has hecho por mí durante estos años y la paciencia que has tenido.

A Jesús García-Foncillas me gustaría agradecerle la confianza que depositó en mí cuando me ofreció la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Oncología Traslacional de la FJD, a pesar de empezar sin tener ni idea de absolutamente nada de los experimentos que se realizan día a día en el laboratorio.

Tampoco puedo olvidarme de Celia, Javi, Melani, Marta, Rober, Nuria y Andrea, que han compartido conmigo esta experiencia y que han sido unos compañeros excepcionales. A ti Celia, mucho ánimo en el final de tu etapa, eres una gran persona y regresarás a tu país siendo una gran profesional. No dudes de que iré a China a visitarte y mantendremos el contacto. A los demás, simplemente os habéis convertido en mis amigos, así que no os librareis tan fácil de mí!

Me gustaría agradecer al Departamento de Anatomía Patológica de la FJD todo lo que he aprendido de vosotros, especialmente a Cristina, Sandra, Iván, Rebeca y Nerea por las diferentes técnicas que me han enseñado. Además, no sé qué habría hecho sin todas las muestras que me habéis facilitado durante estos años para mis proyectos... gracias!

Por último, me gustaría dar las gracias a la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz que me seleccionaran para recibir una beca de investigación con la que he podido llevar a cabo mi proyecto de tesis durante estos cuatro años, permitiéndome crecer profesionalmente.

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera patología tumoral de mayor incidencia y la cuarta causa de muerte más común por cáncer en el mundo. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una serina/treonina fosfatasa que actúa como supresor tumoral regulando un gran número de rutas de señalización de gran relevancia en cáncer, y su desregulación supone un evento crucial en el proceso de transformación maligna. La proteína SET es un potente inhibidor endógeno de PP2A, que se ha descrito frecuentemente desregulado en CCR metastásico (CCRM), donde determina sensibilidad a distintos tratamientos estándar. Así, la sobreexpresión de SET se asocia con una menor supervivencia global (SG) y una menor respuesta a la quimioterapia basada en oxaliplatino (LOHP) y 5-fluorouracilo (5-FU). Este proyecto de investigación se centra en el estudio de los mecanismos moleculares que contribuyen a la desregulación de SET así como en determinar su impacto clínico en pacientes con CCR localizado. Para ello, se han llevado a cabo una gran variedad de ensayos moleculares para evaluar la importancia biológica y funcional de la desregulación de SET, los cuales se describirán en detalle en el contenido de esta memoria.

La tesis doctoral se presenta como un compendio de publicaciones, la primera de las cuales muestra que la expresión de SET y el microRNA-199b (miR-199b), regulador negativo de esta proteína, están inversamente correlacionadas. Así, la sobreexpresión de este miR impide la proliferación celular y aumenta la respuesta a LOHP debido a la activación de PP2A a través de la inhibición de SET. Además, demostramos en este trabajo que los casos con una baja expresión del miR-199b presentan menor SG. En el segundo artículo observamos alta expresión de SETBP1, regulador positivo de SET, en varias líneas celulares de CCR pero con prevalencia muy baja en pacientes, por lo que estudiamos la existencia de mutaciones de SETBP1 como mecanismo alternativo a su sobreexpresión. Sin embargo, no encontramos mutaciones en este gen, por lo que de existir constituyen eventos poco frecuentes en CCR. En el tercer trabajo se analizó la expresión de caveolina 1 (CAV-1) en CCR localizado, proteína relacionada tanto con inhibición de PP2A como con Rac-1, mediador clave en la migración inducida por SET. La baja expresión encontrada en el 76.2% de los casos sugiere que CAV-1 podría actuar como supresor tumoral en estadios tempranos de esta enfermedad. Por último, en el cuarto artículo mostramos que la desregulación de SET se asocia con progresión tumoral y predice un pronóstico adverso en pacientes con CCR localizado. Además, SET regula migración, crecimiento con independencia de anclaje, transición epitelio-mesénquima (TEM) y permite definir a un subgrupo de pacientes de mal pronóstico que podrían beneficiarse del uso de antagonistas de SET en los protocolos clínicos.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most incidence tumor pathology and the fourth common cause of death related with cancer all over the world. Protein phosphatase 2A (PP2A) is a serine/threonine phosphatase that acts as a tumor suppressor regulating many signaling pathways with high relevance in human cancer, and its deregulation is a crucial event in cancer development. SET protein is a potent endogenous PP2A inhibitor that has been described frequently deregulated in metastatic CRC, where it plays an important role in determining sensitivity to different standard treatments. Thus, SET overexpression is associated with a lower overall survival (OS) and a less response to chemotherapy based on oxaliplatin or 5-fluorouracil (5-FU). This research project focuses on the study of the molecular mechanisms that contribute to SET deregulation as well as to determine its clinical impact in patients with localized CRC. For that, a wide variety of molecular assays have been carried out to evaluate the biological and functional importance of SET deregulation, which will be described in detail in the contents of this report.

The doctoral thesis is presented as a compendium of publications, first of which shows that the expression of SET and the miR-199b, a negative regulator of this protein, are inversely correlated. Thus, overexpression of this miR impairs cell proliferation and increases the response to oxaliplatin treatment due to PP2A activation through SET inhibition. Moreover, we demonstrated in this work that those cases with a low expression of miR-199b present a lower OS. In the second article we observed a high expression of SETBP1, positive regulator of SET, in several CRC cell lines but only in two of the patients of our cohort, so we studied the possible existence of mutations in *SETBP1* gene as an alternative mechanism to their overexpression. However, we did not found *SETBP1* mutations in any of the CRC patients samples included in the study so this alterations are, if exist, rare events in CRC patients. In the third work we focused on analyzing the expression of CAV-1 in localized CRC, since it has been described that this protein is related to both PP2A inhibition and Rac-1, a key regulator in the migration induces by SET. The low expression found in the 76.2% of cases suggests that CAV-1 could act as a tumor suppressor in early stages of this disease. Finally, we showed in the fourth article that SET deregulation is associated with tumor progression and predicts an adverse prognosis in patients with localized CRC. We have also observed that SET regulates cell migration, anchorage-independent cell growth, epithelial to mesenchymal transition (EMT) and also defines a subgroup of patients with poor prognosis that could benefit from the use of SET antagonists in clinical protocols.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	19
1. CÁNCER COLORRECTAL.....	21
Epidemiología	21
Etiología.....	22
Fisiopatología.....	23
<i>Alteraciones genéticas</i>	23
<i>Alteraciones epigenéticas</i>	25
Estadaje del CCR	25
Tratamiento del CCR	27
<i>Enfermedad localizada</i>	28
RESECCIÓN QUIRÚRGICA	28
TERAPIA ADYUVANTE	28
TERAPIA NEOADYUVANTE	28
<i>Enfermedad metastásica</i>	28
TRATAMIENTO SISTÉMICO DE PRIMERA LÍNEA.....	29
TRATAMIENTO SISTÉMICO DE SEGUNDA LÍNEA	29
TRATAMIENTO SISTÉMICO DE TERCERA LÍNEA.....	30
2. SET: INHIBIDOR ENDÓGENO DE PP2A.....	31
Introducción.....	31
Funciones fisiológicas de SET.....	32
<i>Ciclo celular</i>	33
<i>Transcripción génica</i>	33
<i>Reparación del ADN</i>	33
<i>Migración celular y metástasis</i>	34
Inhibición de PP2A	34
<i>Introducción</i>	35
<i>Estructura de PP2A</i>	36
<i>Regulación de PP2A</i>	36

Regulación de SET	37
<i>Regulación transcripcional: EVI-1</i>	38
<i>Regulación post-transcripcional: miR-199b</i>	39
<i>Regulación post-traducciona: SETBP1</i>	40
SET en cáncer.....	40
OBJETIVOS.....	43
RESULTADOS.....	47
ARTÍCULO 1: Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer	49
ARTÍCULO 2: Analysis of potential alterations affecting SETBP1 as a novel contributing mechanism to inhibit PP2A in colorectal cancer patients.....	72
ARTÍCULO 3: Caveolin-1 is markedly downregulated in patients with earle-stage colorectal cancer.....	84
ARTÍCULO 4: Deregulation of SET is associated with tumor progression and predicts adverse outcome in patients with early-stage colorectal cancer	92
DISCUSIÓN GENERAL	121
CONCLUSIONES.....	135
BIBIOGRAFÍA.....	139

ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous polyposis coli
CAPOX	Capecitabina + oxaliplatino
CAV-1	Caveolina 1
CDC	Complejos de ciclina
CDK	Quinasas dependientes de ciclina
CCR	Cáncer colorrectal
CCRm	Cáncer colorrectal metastásico
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
DDR	Respuesta al daño en el ADN
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
HAT	Histona Acetiltransferasa
FOLFIRI	Ácido folínico + 5-fluorouracilo + irinotecan
FOLFOX	Ácido folínico + 5-fluorouracilo + oxaliplatino
FOLFOXIRI	Ácido folínico + 5-fluorouracilo + oxaliplatino + irinotecan
INHAT	Inhibidor Histona Acetiltransferasa
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LOHP	Oxaliplatino
MAPK	Mitogen activated protein kinase
miR(s)	MicroRNA(s)
NAP	Proteínas ensambladoras del nucleosoma
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
PP1	Proteína Fosfatasa 1
PP2A	Proteína Fosfatasa 2A

RH	Recombinación homóloga
RPC	Respuesta patológica completa
SETBP1	SET Binding Protein 1
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
TAS-102	Trifluridina + clorhidrato de tipiracilo
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TNM	Tumor Node Metastasis
UTR	Región no traducida
XRTQ	Radio-quimioterapia

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera patología tumoral de mayor incidencia y la cuarta causa de muerte más común por cáncer en el mundo. Más de 2 millones de personas son diagnosticadas cada año de CCR, y más de 600.000 mueren a causa de esta enfermedad. La incidencia de este tipo tumoral es baja en personas menores de 50 años pero se incrementa considerablemente con la edad. Así, la edad media al diagnóstico es de 66 años en hombres y 70 años en mujeres. Además, se ha observado una gran incidencia en países desarrollados de Europa, América del Norte y Oceanía mientras que en países de Asia y África la incidencia es menor (Brenner *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2016). En Europa la incidencia ha aumentado considerablemente debido a los cambios producidos en la dieta y en los factores de riesgo hacia lo que se conoce como “estilo de vida occidental”. Por otro lado, en países como Estados Unidos la incidencia ha comenzado a disminuir debido al incremento en el uso de métodos de detección precoz, como la sigmoidoscopia y la colonoscopia con polipectomía (Center *et al.*, 2009).

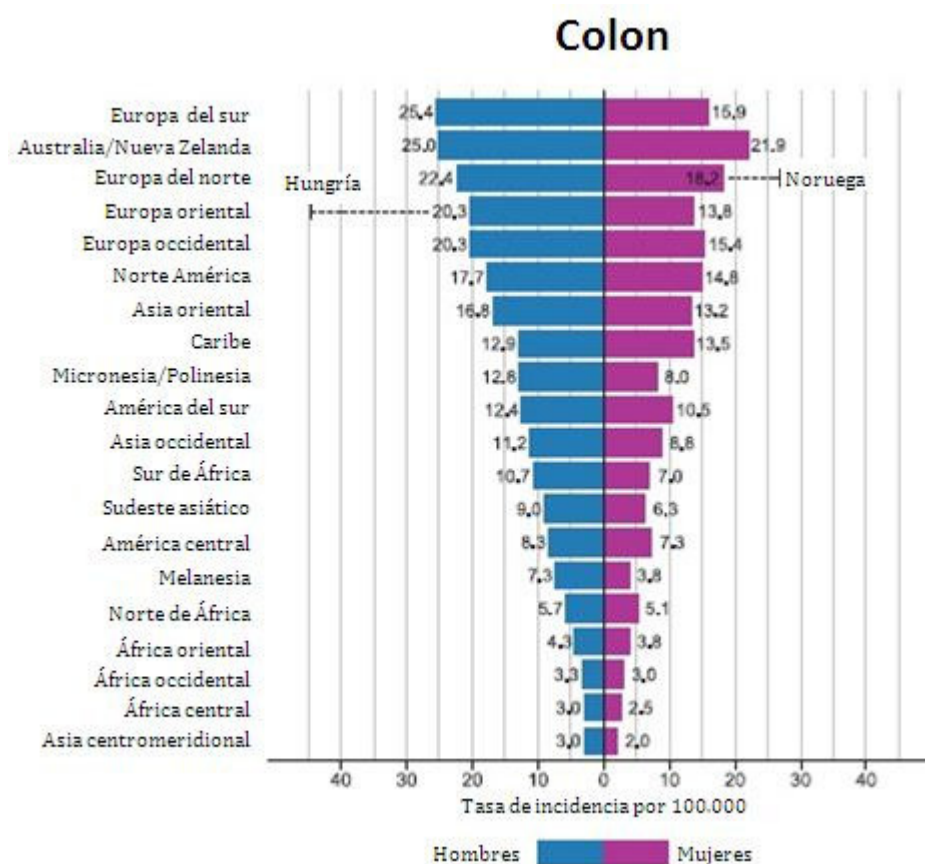


Figura 1. Incidencia mundial del cáncer de colon (adaptada de Bray *et al.*, 2018).

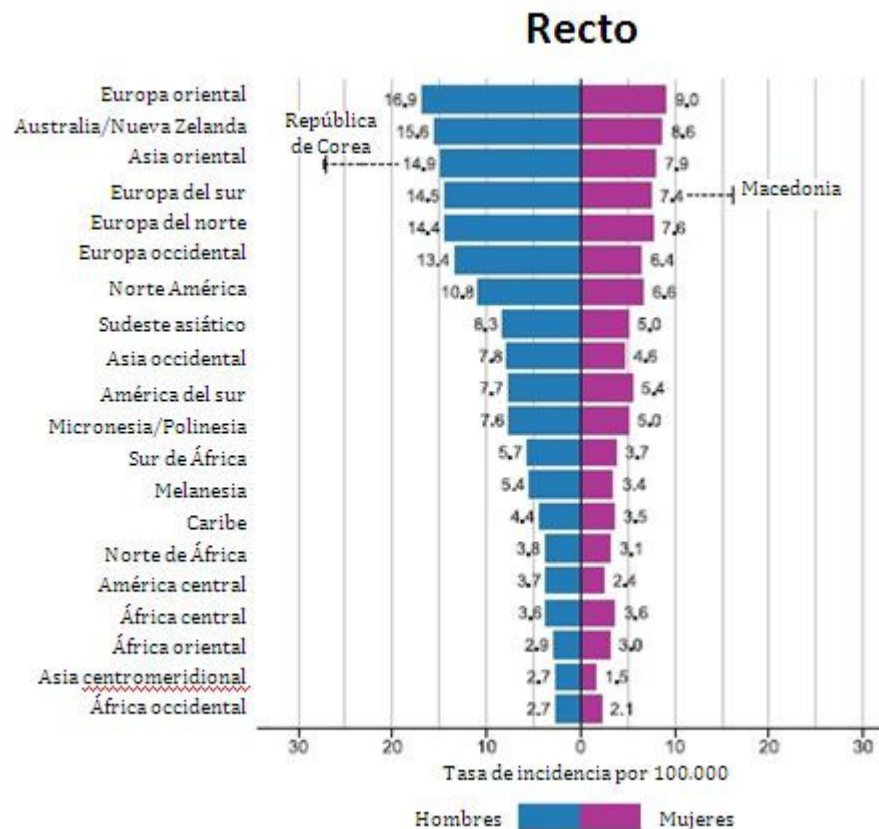


Figura 2. Incidencia mundial del cáncer de recto (adaptada de Bray *et al.*, 2018).

Etiología

Aproximadamente el 98% de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas. Se estima que el 60-80% de los casos diagnosticados son debidos a factores ambientales, como la dieta y el estilo de vida, y el 20-40% restantes se originan en pacientes con un historial familiar previo (Chen *et al.*, 2018). El CCR se puede clasificar en:

- *CCR hereditario.* Comprende un 3-5% de los casos. Se engloban aquí la Poliposis Adenomatosa Familiar, la Poliposis asociada a mutaciones en el gen *MUTYH* y el CCR Hereditario no Polipósico o Síndrome de Lynch.
- *CCR familiar.* Constituye alrededor del 20-40% de los casos. Existe un riesgo dos o tres veces mayor a padecer CCR cuando un familiar de primer grado ha padecido la enfermedad.
- *CCR esporádico.* Agrupa el 60-80% de los casos diagnosticados. Este tipo de CCR surge debido a una exposición continuada a determinados factores ambientales. Sin embargo, la predisposición genética de los pacientes también es un factor importante a tener en cuenta (Cruz-Bustillo *et al.*, 2004).

Fisiopatología

La mayoría de los cánceres colorrectales aparecen sobre un pólipo generado en la mucosa del colon o del recto. Los pólipos adenomatosos son un tipo común que se forman en el colon cuando se alteran los mecanismos que regulan el recambio de células epiteliales que recubren el intestino. La proliferación de estas células se produce a partir de las células madre situadas en la base de la cripta colónica, en donde predominan señales antiapoptóticas (como la proteína Bcl-2) y proliferativas (como la vía Wnt/ β -catenina), y después se mueven hacia la superficie luminal, en donde finalmente se diferencian. Alteraciones en las vías de señalización que regulan este recambio celular pueden iniciar una vía de carcinogénesis y conducir a la aparición del CCR (Sanabria *et al.*, 2012).

El CCR se caracteriza por una acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen al desarrollo del tumor (Carethers *et al.*, 2015). Los mecanismos moleculares que contribuyen a la progresión de esta enfermedad son clínicamente importantes ya que están relacionados con la respuesta al tratamiento y el pronóstico del paciente (De Sousa *et al.*, 2013). En 1990, Fearon y Vogelstein propusieron el modelo de desarrollo tumoral como un proceso secuencial (secuencia adenoma-carcinoma) en el cual la acumulación de mutaciones germinales y somáticas condiciona las características del tumor. Según los autores, los tumores colorrectales surgen como consecuencia de la activación mutacional de oncogenes acompañado de la inactivación mutacional de genes supresores de tumores. Estas mutaciones, que serán las responsables de las propiedades biológicas del tumor, deben ocurrir en al menos cuatro o cinco genes para que se desarrolle la enfermedad. La acumulación de estas alteraciones confiere a las células colónicas epiteliales una selectiva ventaja en el crecimiento (Fearon *et al.*, 1990). Estudios posteriores han afianzado esta hipótesis y han determinado que mutaciones en el gen *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*), característico tanto de CCR esporádico como hereditario, ocurre al inicio del proceso, mientras que las mutaciones en el gen supresor p53 se producen, generalmente, más tarde. Además de estas mutaciones se producen otros cambios genéticos como reordenamientos genéticos, amplificaciones, sobreexpresiones y deleciones (Carethers *et al.*, 2015), así como una acumulación de cambios epigenéticos entre los que caben destacar la metilación del ADN, alteraciones en microRNAs, modificación de histonas y remodelación de la cromatina (Okugawa *et al.*, 2015).

Alteraciones genéticas

El CCR surge como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas en genes específicos. Estas alteraciones pueden ser mutaciones “conductoras”, que confieren a la célula una ventaja de crecimiento fundamental para su transformación neoplásica, o

mutaciones “pasajeras”, que aparecen tanto en células normales como en cancerosas y que no determinan necesariamente el desarrollo del cáncer (Alshemmari *et al.*, 2016; Mehnert *et al.*, 2012). Estudios recientes ponen de manifiesto que el número medio de mutaciones no sinónimas (aquellas que dan lugar a un nuevo aminoácido, generando cambios estructurales o funcionales en la secuencia de la proteína) en CCR es de 66 por tumor, de las cuales solamente entre 2 y 8 de ellas son mutaciones conductoras (Zhang *et al.*, 2014). Además, la mutación conductora que origina el tumor puede ser distinta entre distintos pacientes, lo que hace que cada paciente sea genéticamente distinto y sea necesario desarrollar terapias personalizadas en cada caso. Sin embargo, hay ciertos genes cuyas mutaciones son más frecuentes. La mutación más temprana en la progresión del CCR es en el gen *APC*, que actúa como supresor tumoral; normalmente la proteína APC se asocia con β -catenina y promueve su destrucción. Cuando el *APC* muta no se produce la unión a β -catenina por lo que los niveles intranucleares de ésta aumentan uniéndose al ADN y activando la transcripción de genes responsables de la formación de adenomas. Después de que el gen *APC* pierda su función mutan otros genes entre los que se incluyen *KRAS*, *p53* y *DCC* (Vogelstein *et al.*, 2013).

KRAS es una proteína G con propiedad GTPasa que funciona como interruptor molecular y transductor de señales extracelulares (Malumbres *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2009). La cascada de señalización RAS constituye una de las principales vías de control de la regulación del ciclo celular, apoptosis, migración, crecimiento, quimiotaxis, diferenciación y proliferación celular (Jancik *et al.*, 2010). Casi el 50% de los casos de CCR presentan mutaciones en *KRAS* (Porru *et al.*, 2018). La mayoría de estas mutaciones ocurren en los codones 12 y 13 y dan lugar a la pérdida de su actividad GTPasa y a la activación aberrante de vías de señalización como la ruta de las MAP quinasas (MAPK) y la vía de Akt/PKB. Además, se ha demostrado que estas mutaciones en *KRAS* permiten identificar a aquellos pacientes con CCRm que no se beneficiarán de los tratamientos con terapias anti-EGFR (factor de crecimiento epidérmico) como cetuximab y panitumumab (Siddiqui *et al.*, 2010).

Por otro lado, la proteína BRAF es una serina/treonina quinasa que se activa por RAS y juega un importante papel en la ruta de las MAPK (Lavoie *et al.*, 2015). Saxena y colaboradores describen en su trabajo que entre el 5 y 25% de los carcinomas colorrectales presentan mutaciones en BRAF (Saxena *et al.*, 2018). Se han identificado varias mutaciones distintas para esta proteína, sin embargo en el 80% de los casos se produce la sustitución de una valina por una molécula de ácido glutámico en el residuo 600 (V600E) (Barras *et al.*, 2015). La proteína resultante de esta alteración genética tiene una mayor actividad quinasa que la misma proteína en condiciones normales (Davies *et al.*, 2002). Por otra parte, al

contrario que en el caso de las mutaciones en KRAS, las alteraciones de BRAF no sirven como marcador predictivo de respuesta en las terapias anti-EGFR (Rowland *et al.*, 2015) aunque si son consideradas como un marcador pronóstico negativo en pacientes con CCRm (Van Cutsem *et al.*, 2011). La cuádruple combinación de 5-FU, LOHP, irinotecan y bevacizumab parece ser la mejor opción de tratamiento ya que estos pacientes no suelen beneficiarse de las terapias basadas en inhibidores de BRAF, como vemurafenib y dabrafenib (Cohen *et al.*, 2017)

Alteraciones epigenéticas

En 1942 Conrad Hal Waddington estableció el término “epigenética” para describir los mecanismos que modifican la estructura de la cromátida y afectan los niveles de la expresión de genes, sin cambios en la secuencia de ADN. Las alteraciones epigenéticas más frecuentes en CCR incluyen metilación, acetilación e hidroxilación del ADN, modificación anormal de histonas, remodelación de la estructura de la cromatina y alteración en los niveles de expresión de varios ARNs no codificantes, incluyendo microRNAs (miRs) (Okugawa *et al.*, 2015). Estas modificaciones epigenéticas tienen una gran importancia en el desarrollo del cáncer ya que afectan a la expresión de genes supresores de tumores, oncogenes y genes del sistema de reparación del ADN (Duthie *et al.*, 2011).

Actualmente, diversos estudios sugieren que las alteraciones epigenéticas podrían ser el evento iniciador en algunos tumores (Sharma *et al.*, 2010; Valeri *et al.*, 2009). Asimismo, varios trabajos ponen de manifiesto que estas modificaciones se producen en fases tempranas del CCR y se manifiestan de una manera más frecuente que las alteraciones genéticas (Menéndez *et al.*, 2012; Juárez-Vázquez *et al.*, 2014). Además, los avances en las tecnologías genómicas han permitido identificar una gran variedad de alteraciones epigenéticas específicas que podrían ser utilizadas como biomarcadores para la detección temprana del CCR (Okugawa *et al.*, 2015).

Se han caracterizado tres vías principales para el desarrollo del CCR; la más común de todas ellas es la inestabilidad cromosómica, que se encuentra en el 70-80% de los tumores. La segunda vía más común es la inestabilidad de microsatélites, que genera lo que se conoce como tumores con errores de replicación en un 5-20% de los casos de CCR. Finalmente, la tercera alteración epigenética más común en esta enfermedad es la causada por el fenotipo metilador de islas CpG, que representa aproximadamente el 15% de los casos con CCR (Puccini *et al.*, 2017).

Estadía del CCR

Una vez que se ha detectado el CCR es necesario realizar una colonoscopia para detectar tumores sincrónicos, los cuales están presentes en el 2-4% de los pacientes

(Brenner *et al.*, 2014), y para la determinación del estadio del CCR. Aproximadamente, el 25% de los nuevos casos diagnosticados presentan metástasis distante en el momento del diagnóstico (Kirstein *et al.*, 2014), siendo la localización metastásica más común el hígado, seguido del pulmón (Brenner *et al.*, 2014).

El sistema de estadificación que se emplea con más frecuencia para el cáncer colorrectal es el sistema *Tumor Node Metastasis* (TNM) del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que se basa en tres criterios fundamentales:

- Tamaño del tumor (T), en función de las capas afectadas en el colon o recto.
- Propagación a los ganglios linfáticos adyacentes (N).
- Propagación a sitios distantes (M).

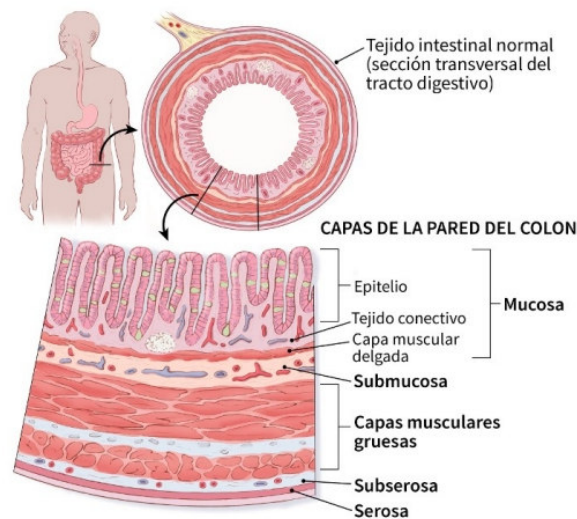


Figura 3. Capas de la pared del colon (American Cancer Society, 2018).

En base a esto el CCR se puede clasificar de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación de CCR en base al sistema TNM.

Tumor primario (T)	
Tx	Tumor primario desconocido
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . Tumor intraepitelial o que invade la lámina propia
T1	Tumor que invade submucosa
T2	Tumor que invade muscularis propia
T3	El tumor invade a través de la muscularis propia hasta el interior de la subserosa
T4a	El tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade otros órganos

Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	No se puede asegurar invasión en ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis de los ganglios linfáticos pericólicos
N1a	Metástasis en un ganglio regional
N1b	Metástasis en dos o tres ganglios regionales
N1c	Depósito tumoral en la subserosa, mesenterio o en tejidos perirectales o pericólicos sin metástasis en los ganglios regionales.
N2a	Metástasis entre cuatro y seis ganglios regionales
N2b	Metástasis en más de siete ganglios regionales
Metástasis distante (M)	
M0	No hay metástasis distante
M1a	Metástasis distante en un órgano (hígado, pulmón, ovario...)
M1b	Metástasis en más de órgano o en el peritoneo

(Adaptada de Brenner *et al.*, 2014)**Tabla 2. Estadíos del CCR**

Estadío	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 a T2	N1/N1C	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3 a T4a	N1/N1C	M0
	T2 a T3	N2a	M0
	T1 a T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3 a T4a	N2b	M0
	T4b	N1 A N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

(Adaptada de Brenner *et al.*, 2014)**Tratamiento del CCR**

La clasificación TNM proporciona las bases necesarias para decidir qué tratamiento se dará a cada paciente.

Enfermedad localizada

RESECCIÓN QUIRÚRGICA

Es el tratamiento de elección para pacientes con tumores localizados en estadios I, II y III (Kuipers *et al.*, 2015).

TERAPIA ADYUVANTE

Tratamiento sistémico indicado para aquellos pacientes a los que se les ha practicado la resección quirúrgica. El objetivo de este tratamiento es eliminar las micrometástasis reduciendo así la probabilidad de recaída (Labianca *et al.*, 2010). Sin embargo, los mayores beneficios de esta terapia los obtienen aquellos pacientes en estadio III ya que se disminuye el riesgo de recurrencia en un 30% y la mortalidad en un 22-32% (Gill *et al.*, 2004). El tratamiento de elección para estos pacientes es el formado por LOHP, 5-FU y leucovorina (FOLFOX), o el formado por capecitabina y LOHP (CAPOX), que aumenta en un 7% y 4.4% respectivamente la supervivencia libre de progresión (SLP) (Binefa *et al.*, 2014). Sin embargo, la quimioterapia adyuvante basada en LOHP produce neurotoxicidad varios meses después de la última exposición a la droga, lo que dificulta la individualización de la dosis por la falta de homogeneidad en sus efectos secundarios en los distintos pacientes (Grothey *et al.*, 2018).

TERAPIA NEOADYUVANTE

Tratamiento que se administra antes de la cirugía para tratar de reducir el tamaño del tumor y así hacer más fácil la resección quirúrgica. Este método se utiliza principalmente para tratar el cáncer de recto (Tamas *et al.*, 2015). Los pacientes con tumores rectales en estadio I no reciben un tratamiento adicional a la resección quirúrgica ya que el grado de recurrencia es bajo y los beneficios obtenidos en este tipo de terapias son muy pequeños (Van Gijn *et al.*, 2011). Los pacientes con estadio III se benefician de este tipo de tratamiento, pero en los pacientes en estadio II no se ve de manera clara este beneficio (Hofheinz *et al.*, 2012; Aschele *et al.*, 2011). Los tratamientos neoadyuvantes más empleados son los basados en fluoropirimidinas junto con radioterapia de fraccionamiento convencional, en lo que se conoce como radio-quimioterapia (XRTQ). Estudios randomizados han destacado que la XRTQ preoperatoria provoca la disminución del tamaño tumoral y la incidencia de recurrencia local, pero sólo un 10-30% de los pacientes sometidos a XRTQ logran una respuesta patológica completa (RPC) (Yeo *et al.*, 2010).

Enfermedad metastásica

Aproximadamente el 25% de los casos de cáncer colorrectal presentan metástasis al diagnóstico (metástasis sincrónicas) (Kirstein *et al.*, 2014), representando el grupo de pacientes con peor pronóstico. Sin embargo, en la última década han mejorado mucho los

resultados clínicos de este grupo gracias a la aparición de nuevas terapias, como irinotecan, LOHP, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, aflibercept, regorafenib y TAS-102 (Kirstein *et al.*, 2014).

TRATAMIENTO SISTÉMICO DE PRIMERA LÍNEA

La primera opción de tratamiento en pacientes con CCRm son derivados de fluoropirimidinas, como 5-FU y capecitabina, usados en combinación con irinotecan (FOLFIRI) o LOHP (FOLFOX) (Van Cutsem *et al.*, 2014), que proporcionan mayores tasas de respuesta y mejores SLP y SG que con la fluoropirimidina sola. La capecitabina es menos frecuente usarla en combinación con irinotecan ya que es más tóxico que el FOLFIRI (Fuchs *et al.*, 2007). Por otra parte, los anticuerpos monoclonales bevacizumab (anti-VEGF) y cetuximab y panitumumab (anti-EGFR) han conseguido obtener mejores resultados en pacientes de CCRm cuando se combinan con FOLFOX o FOLFIRI en primera línea de tratamiento (Bokemeyer *et al.*, 2009; Douillard *et al.*, 2013; Saltz *et al.*, 2008). Además, esta combinación de quimioterapia con anticuerpos monoclonales no presenta contraindicaciones y es el tratamiento de elección para pacientes con CCRm en primera línea.

El estado mutacional de *KRAS* determina si un paciente puede beneficiarse o no de terapias anti-EGFR (Amado *et al.*, 2008; Lièvre *et al.*, 2006). Así, aquellos pacientes con *KRAS* mutado no responderán a terapias basadas en cetuximab (Karapetis *et al.*, 2008) pero se podrán beneficiar de la combinación de quimioterapia con bevacizumab; sin embargo, para los pacientes de CCRm que presentan *KRAS* nativo no hay ninguna evidencia que indique que los anticuerpos anti-VEGF funcionarán mejor que los anti-EGFR (Heinemann *et al.*, 2014). Por lo tanto, las opciones terapéuticas en primera línea para los pacientes con CCRm son, en su gran mayoría, FOLFOX, FOLFIRI o CAPOX. Además, pacientes menores de 70 años, pacientes entre 71 y 75 años con ECOG 0-1 (que indica buen estado general) y pacientes con menor riesgo de toxicidad podrían beneficiarse del triplete citotóxico formado por 5-FU, LOHP e irinotecan, ya que aumenta la tasa de respuesta y mejora la SLP y SG (Falcone *et al.*, 2007). Por otro lado, aquellos pacientes con enfermedad metastásica y sin posibilidad de resección quirúrgica suelen recibir fluoropirimidina en monoterapia (Van Cutsem *et al.*, 2014).

TRATAMIENTO SISTÉMICO DE SEGUNDA LÍNEA

Cuando el tratamiento inicial deja de ser eficaz y el paciente presenta un buen estado general se propone una segunda línea de tratamiento. Los pacientes que recibieron FOLFIRI deberían recibir FOLFOX, y viceversa (Tournigand *et al.*, 2004). Además, si el paciente no recibió bevacizumab en primera línea sería aconsejable una terapia basada en

FOLFOX más bevacizumab, ya que se ha demostrado que esta combinación mejora la SG en comparación con FOLFOX en monoterapia (Bennouna *et al.*, 2013; Giantonio *et al.*, 2007). Asimismo, diversos estudios mostraron que aquellos pacientes que fueron tratados con bevacizumab en primera línea pueden beneficiarse de posteriores terapias que tengan a VEGF como diana (Masi *et al.*, 2015).

Aflibercept es una proteína de fusión anti-angiogénica que bloquea la actividad de VEGFA, VEGFB y PlGF y confiere una ventaja en cuanto a supervivencia cuando se combina con FOLFIRI y se administra a pacientes que han progresado en un régimen basado en LOHP (Masi *et al.*, 2015). Además, pacientes que recibieron bevacizumab se pueden beneficiar del tratamiento con aflibercept (Tabernero *et al.*, 2015).

Ramucirumab es un anticuerpo anti-VEGFR2 que en combinación con FOLFIRI también produce una mejora en la SG tras una primera línea de tratamiento con fluoropirimidina, LOHP y bevacizumab (Tabernero *et al.*, 2015).

Cetuximab y panitumumab pueden ser utilizados si no se emplearon previamente en la primera línea de tratamiento de pacientes con *KRAS* nativo (Sobrero *et al.*, 2008).

TRATAMIENTO SISTÉMICO DE TERCERA LÍNEA

Varios estudios han mostrado que cetuximab y panitumumab son dos fármacos eficaces en la tercera línea de tratamiento en pacientes con tumores *KRAS* nativo (Van Cutsem *et al.*, 2011; Hecht *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que cetuximab tiene una actividad clínicamente significativa cuando se administra en monoterapia o en combinación con irinotecan en pacientes que han desarrollado resistencia a irinotecan (Rossini *et al.*, 2017).

Regorafenib es un fármaco perteneciente a la familia de los inhibidores quinasa que ha demostrado mejorar de manera significativa la SG en pacientes previamente tratados con citotóxicos, bevacizumab y/o los anticuerpos anti-EGFR, por lo que puede ser propuesto como un tratamiento estándar en este contexto. Sin embargo, es aconsejable monitorizar la toxicidad producida por este fármaco (Grothey *et al.*, 2013).

Actualmente se ha desarrollado un agente oral que combina trifluridina y clorhidrato de tipiracilo (TAS-102) y está especialmente indicado en el tratamiento de pacientes con CCRm refractario, ya que produce una mejora en la SG similar que con regorafenib pero este nuevo fármaco presenta una toxicidad limitada (Mayer *et al.*, 2015).

2. SET: INHIBIDOR ENDÓGENO DE PP2A

Introducción

La proteína SET, también conocida como I2PP2A/TAF-I β , es una oncoproteína multifuncional de 39 kDa involucrada en un gran número de procesos celulares. Esta proteína pertenece a la familia de histonas chaperonas NAP1 (Hung *et al.*, 2017) y se expresa de manera ubicua en muchos tipos de tejido humano incluyendo riñón, hígado, cerebro, bazo, pulmón, corazón y sistema gonadal (Nagata *et al.*, 1998). El gen que codifica SET fue inicialmente identificado en el gen de fusión *set-can* en un paciente de leucemia mieloide aguda (LMA) no diferenciada, y también se describió fusionado a la nucleoporina Nup214 en LMA (von Lindern *et al.*, 1992), revelando así por primera vez la conexión entre SET y cáncer. Por otro lado, se ha identificado a SET como un componente del complejo inhibitorio de histona-acetiltransferasas (INHAT), que se une de manera directa a las histonas y evita que sirvan como sustratos de las histona-acetiltransferasas (HAT) (Stevens *et al.*, 2018).

Estructura y localización subcelular de SET

El gen *SET* está formado por 8 exones y se localiza en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34) (Hung *et al.*, 2017). Existen tres regiones estructurales que son determinantes de su actividad y de su especificidad funcional (Karetsou *et al.*, 2009). En primer lugar encontramos la región N-terminal (aminoácidos 1-76), que forma una hélice superenrollada que se cree que media en la dimerización de la proteína, la cual es necesaria para desarrollar su actividad de remodelación de la cromatina (Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 1999). En segundo lugar encontramos el dominio homólogo de proteínas ensambladoras del nucleosoma (NAP) (aminoácidos 80-225), que es una región altamente conservada en la familia de proteínas NAP1 y se cree que media en la unión específica de las histonas (Park *et al.*, 2006). Saito y colaboradores demuestran en su trabajo que la región comprendida entre los aminoácidos 25-119 es un dominio funcional de unión a PP2A que produce la inhibición de la fosfatasa (Saito *et al.*, 1999). Finalmente, en el extremo C-terminal (aminoácidos 226-277) se localiza una zona rica en ácidos glutámico y aspártico que parece adoptar una estructura intrínsecamente desordenada que proporciona plasticidad estructural (Karetsou *et al.*, 2009). Además, esta región C-terminal ácida es la que forma parte del complejo INHAT, la cual es capaz de unirse a los residuos de lisina de los extremos N-terminales de las histonas, enmascarándolas para evitar ser reconocidas por las HAT (Seo *et al.*, 2001).

La estructura cristalina muestra que SET forma dímeros y cada subunidad está formada por un dominio N-terminal con una región superenrollada, un esqueleto en forma

de hélice en la parte central y un dominio con forma de “orejera” compuesto por 6 hélices- α y 4 láminas- β (Muto *et al.*, 2007) (Figura 4).

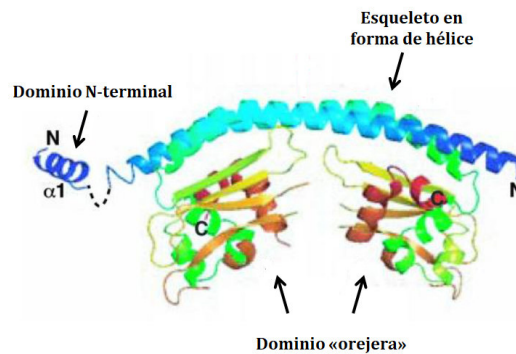


Figura 4. Estructura dimérica de SET (Muto *et al.*, 2007).

SET fue inicialmente identificada como una proteína predominantemente nuclear (Adachi *et al.*, 1994). Sin embargo, los estudios de Saito y sus colaboradores revelaron que existe una forma truncada de SET, consecuencia de la pérdida de la región C-terminal, que se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que la forma completa se encuentra en el núcleo (Saito *et al.*, 1999). Además, se ha descrito la presencia de tres isoformas cortas de SET de 27, 24 y 20 kDa en LMA como consecuencia del procesamiento post-traducciona via Granzyme A de la isoforma completa de 39 kDa y con una funcionalidad y estabilidad alteradas respecto a ella (Cristóbal *et al.*, 2010; Beresford *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2003).

Funciones fisiológicas de SET

La proteína SET participa de manera activa en numerosos procesos celulares y juega un papel esencial en supervivencia celular y proliferación (Figura 5).

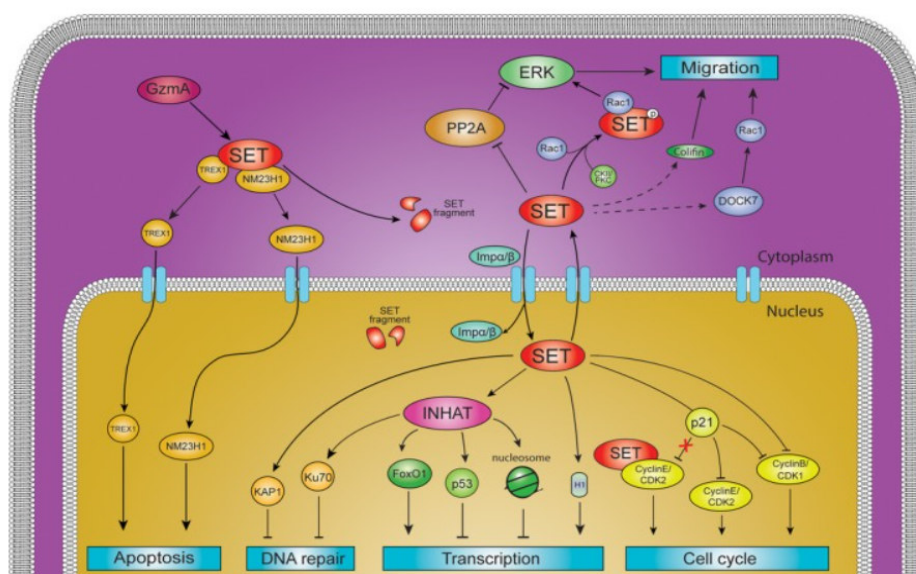


Figura 5. Perspectiva general de las funciones fisiológicas de SET y proteínas con las que interactúa (Bayarkhangai *et al.*, 2018).

Ciclo celular

El proceso de división celular está regulado por quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y complejos de ciclina (CDCs) (Gopinathan *et al.*, 2011). p21^{Cip1} es conocido como un potente inhibidor de CDKs. SET interacciona con p21^{Cip1} y modula específicamente su efecto inhibitorio sobre la actividad del complejo ciclina E-CDK2, que es necesario para la transición G1/S. Además, p21^{Cip1} y SET cooperan también en la inhibición de la ciclina B-CDK1 durante la fase S/G2 (Canela *et al.*, 2003). Por otra parte, SET puede unirse directamente al supresor tumoral p53 y suprimir su activación promoviendo así la transición G1/S durante el ciclo celular (Kim *et al.*, 2012).

Transcripción génica

SET pertenece a la familia de proteínas que participan en el ensamblaje del nucleosoma. Diversos estudios han demostrado que SET estimula o reprime la expresión de genes como *p53* (Wei *et al.*, 2018) y *FoxO1* (Chae *et al.*, 2014) entre otros, ya que es capaz de interactuar con el núcleo de histonas independientemente del estado de acetilación existente (Kato *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2011). Además, SET remodela la estructura de la cromatina para facilitar el reconocimiento de ADN por factores de transcripción o por la ADN Polimerasa II para iniciar el proceso de transcripción. La histona H1 participa en la formación y estabilización de las estructuras plegadas de cromatina. SET es capaz de expulsar a H1 del nucleosoma evitando la represión génica inducida por ésta (Kajitani *et al.*, 2017).

La acetilación de histonas mediada por p300/CBP y PCAF es un mecanismo clave en la modificación de la cromatina y regulación transcripcional. Seo y sus colaboradores han demostrado que el complejo multiproteico INHAT, que contiene a la oncoproteína SET entre sus principales dominios, inhibe la actividad acetiltransferasa de p300/CBP y PCAF por el enmascaramiento de histonas (Seo *et al.*, 2001).

Por otra parte, la proteína SET también es un importante regulador de la expresión génica mediada por receptores hormonales, ya que es capaz de interactuar con el receptor de glucocorticoides, receptor de hormona tiroidea y con el receptor de estrógenos a través de sus dominios “orejera”, reprimiendo así la activación transcripcional inducida por estas hormonas y afectando incluso a su propia expresión a través de PP2A (Loven *et al.*, 2003; Ichijo *et al.*, 2008; Cristóbal *et al.*, 2017).

Reparación del ADN

El estrés oxidativo puede causar alteraciones cromosómicas, daño en el ADN y mutaciones, contribuyendo de esta manera al desarrollo y progresión del tumor (Kang *et al.*, 2002). La fragmentación del ADN de doble cadena es reparada por dos mecanismos

principales: recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Kim *et al.*, 2014). Ku70/80 es un heterodímero que se une a los extremos de la doble hebra fragmentada e inicia el proceso de reparación mediante NHEJ. Kim y sus colaboradores demuestran en su trabajo que SET interacciona con Ku70/80 e inhibe su reclutamiento a los sitios dañados, impidiendo así el proceso de reparación del ADN (Kim *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que la proteína SET regula la reparación del ADN actuando como represor de HR y de respuesta al daño en el ADN (DDR) (Kalousi *et al.*, 2015). Por otro lado, SET puede unirse a KAP1 creando un ambiente represivo para la reparación del ADN (Kalousi *et al.* 2015).

Migración celular y metástasis

Diversos componentes de señalización intracelular, como GTPasas de pequeño tamaño de las familias Ras, Rab, Arf y Rho, cooperan en el proceso de migración celular (Oxford *et al.*, 2003). Se sabe que la GTPasa Rac-1, perteneciente a la familia Rho, controla adhesión celular, crecimiento y migración (Evers *et al.*, 2000) y ensayos *in vivo* e *in vitro* han confirmado que Rac-1 se asocia con SET. Tras la activación de Rac-1 en el citosol, SET se transloca desde el núcleo hasta la membrana plasmática y amplifica la señalización mediada por quinasas. Todo este proceso depende de la fosforilación sobre el residuo Ser-9 y monomerización de SET, y del enlace de éste a Rac-1. Simultáneamente, SET inhibe a PP2A, que a su vez regula negativamente la señalización de Rac-1. Finalmente, el complejo SET-Rac-1 coopera para inducir movilidad celular (ten Klooster *et al.*, 2007).

Por otro lado, SET forma complejos con NM23-H1, supresor tumoral de metástasis, inhibiendo su capacidad para romper y separar las hebras de ADN (Fan *et al.*, 2003). La digestión proteolítica de SET o el uso de algún antagonista de éste revierte la inactivación de NM23-H1, reestableciendo su actividad anti-metastásica e induciendo apoptosis independiente de caspasas (Beresford *et al.*, 2001).

Cristóbal y sus colaboradores demuestran en su trabajo que la sobreexpresión de SET es un evento frecuente en CCRm, ya que el 24.8% de los pacientes con esta enfermedad presentaron una alta expresión de esta proteína. Además, esta alteración se asoció con un peor pronóstico y resistencia a tratamientos basados en LOHP, permitiendo definir un subgrupo de pacientes que podrían beneficiarse del uso de antagonistas de SET (Cristóbal *et al.*, 2015).

Inhibición de PP2A

Una de las funciones más relevantes que se han descrito para SET es su capacidad de funcionar como un potente inhibidor endógeno del supresor tumoral PP2A. Diversos estudios sugieren que el mecanismo por el cual SET inhibe a PP2A es a través de la unión

directa con su subunidad catalítica, impidiendo así la unión de la subunidad reguladora y, por tanto, la formación del complejo heterotrimérico de PP2A (Oaks *et al.*, 2014) (Figura 6).

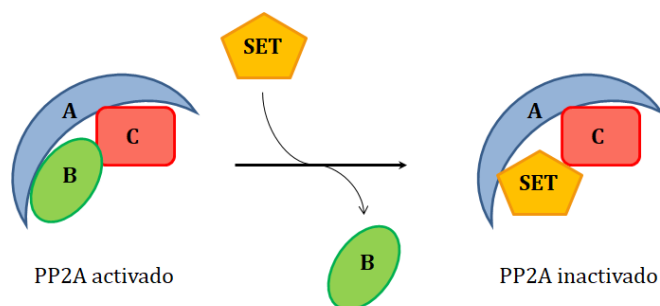


Figura 6. Inhibición del complejo PP2A a través de la proteína SET.

Introducción

La mayoría de los procesos celulares están regulados por rutas de señalización, en los que los procesos de fosforilación-desfosforilación juegan un papel esencial. El grado de fosforilación de las proteínas está bajo control de las quinasas y fosfatasa, que mantienen la homeostasis celular y evitan el desarrollo tumoral (Bononi *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que las alteraciones que afectan a la actividad de las proteínas quinasas son recurrentes en un gran número de tumores. Sin embargo, el papel de las fosfatasa no se conoce con el mismo nivel de detalle. Mientras que la fosforilación aberrante, derivada de la actividad anormal de proteínas quinasas, conducen a la activación constitutiva de rutas de señalización ligadas a la transformación neoplásica, las proteínas fosfatasa desempeñan un papel importante en la regulación negativa de dichas rutas. De hecho, la inactivación de diferentes fosfatasa con función supresora tumoral se ha detectado en varios tipos de cáncer, como la tirosina fosfatasa PTPRD en glioblastoma (Veeriah *et al.*, 2009), la proteína dual PTEN en cáncer de próstata (Whang *et al.*, 1998) y la proteína PP2A en cáncer colorrectal (Cristóbal *et al.*, 2014) entre otros ejemplos.

El término PP2A no hace referencia a única proteína sino a un conjunto de enzimas oligoméricas con actividad serina-treonina fosfatasa que, junto con la proteína fosfatasa 1 (PP1), suponen en torno al 90% de la actividad serina-treonina fosfatasa presente en células eucariotas (Millwaard *et al.*, 1999). Se ha demostrado la importancia de PP2A en la regulación de muchas vías de señalización de elevada relevancia en cáncer, como la ruta de las MAPKs o la de PI3K/AKT, en donde PP2A modula el estado de fosforilación/activación de importantes transductores de señales como ERK y AKT (Janssens *et al.*, 2001; Zolnierowicz *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2015). Existen numerosas evidencias que sugieren que la desregulación de PP2A supone un evento crucial para el desarrollo del cáncer (Westermarck *et al.*, 2008; Eichhorn *et al.*, 2009).

Estructura de PP2A

PP2A juega un papel esencial como supresor tumoral regulando un gran número de rutas de señalización. Esta proteína fosfatasa no es una entidad única, sino un complejo heterotrimérico cuyo núcleo enzimático está formado por una subunidad A estructural (también conocida como PR65 ó PPP2R1) y una subunidad C catalítica (también llamada PP2Ac ó PPP2C) que dan lugar a un heterodímero A-C (Figura 7). A este heterodímero A-C se une una tercera subunidad B reguladora cuya función consiste en determinar tanto la especificidad de sustrato del complejo enzimático como su localización intracelular. Hasta el momento se han identificado 4 familias de subunidades B reguladoras; por lo tanto PP2A puede formar un gran número de complejos diferentes que interactúan con muchos sustratos distintos.

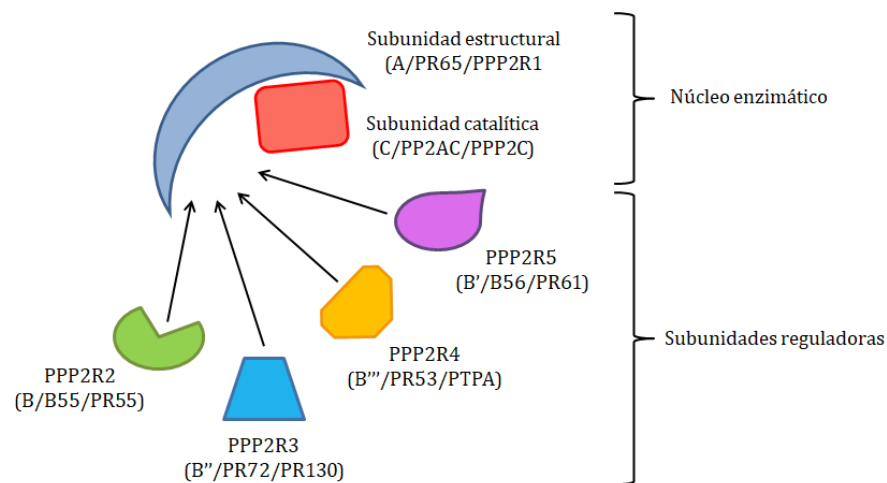


Figura 7. Estructura del complejo de PP2A (adaptada de Westermack y Hahn, 2008).

Regulación de PP2A

La formación de cada uno de los posibles complejos específicos de PP2A está estrechamente regulada. Esta regulación se puede producir a través de modificaciones post-traduccionales, como pueden ser la metilación y fosforilación en el extremo C-terminal de la subunidad catalítica (Janssens *et al.*, 2008). De hecho, Chen y colaboradores muestran en su trabajo que la fosforilación sobre el residuo Y307 contribuye a la inactivación de PP2A (Chen *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado en un trabajo reciente que el tratamiento con forskolina produce la defosforilación sobre dicho residuo y aumenta la actividad de PP2A (Cristóbal *et al.*, 2014). Por otro lado, se han descrito otros mecanismos que producen la inactivación de PP2A, como modificaciones post-transcripcionales mediante la expresión de microRNAs (Qiu *et al.*, 2014) y mediante alteraciones que afectan a alguna de las subunidades del complejo PP2A (Cristóbal *et al.*, 2013). Además, distintos factores, como por ejemplo proteínas virales, pueden unirse a los complejos de PP2A afectando a su actividad fosfatasa. Por otra parte, también se ha descrito la existencia de

inhibidores endógenos de PP2A, como SET y CIP2A (Neviani *et al.*, 2005; Junttila *et al.*, 2007) (Figura 8). Diversos estudios señalan que la expresión de SET está incrementada en varios tipos de cáncer, incluyendo LMA (Cristóbal *et al.*, 2012), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Leopoldino *et al.*, 2012), cáncer de mama (Saddoughi *et al.*, 2013), CCR (Cristóbal *et al.*, 2015), cáncer de páncreas (Mody *et al.*, 2017), cáncer gástrico (Yuan *et al.* 2017), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (Liu *et al.*, 2015) y carcinoma hepatocelular (Hung *et al.*, 2016) entre otros, contribuyendo en estas enfermedades a la disminución de la actividad de PP2A.

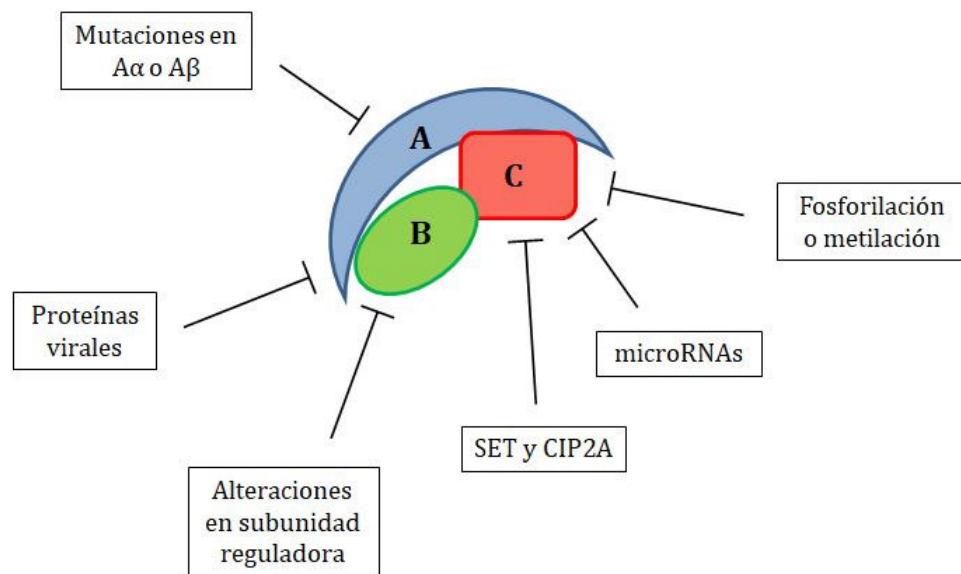


Figura 8. Regulación del complejo PP2A.

Regulación de SET

Debido a su papel esencial en diferentes procesos celulares, las células emplean múltiples mecanismos reguladores para modular la expresión, forma y distribución de SET, que se correlaciona estrechamente con su función fisiológica (Figura 9).

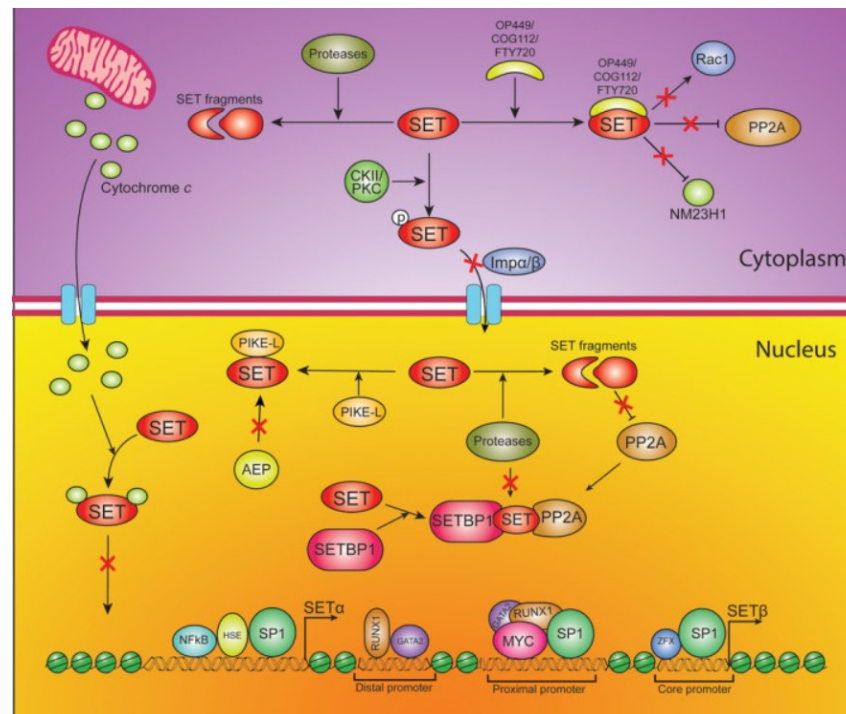


Figura 9. Regulación transcripcional y post-traducciona de SET (Bayarkhangai *et al.*, 2018).

Regulación transcripcional: EVI-1

La región corriente arriba del promotor de SET contiene varios elementos de unión a factores de transcripción como HSE, SP1 y NFκB. De hecho, recientemente se ha demostrado que el reclutamiento de SP1 y NFκB es necesario para la expresión de SET (Feng *et al.*, 2017;). En LMA se han descrito dos regiones importantes dentro del promotor de SET que albergan distintos motivos reguladores para factores de transcripción, entre los que se incluyen RUNX1 y GATA2 en la región distal del promotor, y SP1 y MYC en la región proximal (Pippa *et al.*, 2017). La delección de alguno de estos cuatro factores supone la disminución de los niveles de expresión de SET (Pippa *et al.*, 2017).

EVI-1 es un oncogén que se localiza en el cromosoma 3, mapeando en 3q26.2, y que actúa principalmente como factor de transcripción (Bard-Chapeau *et al.*, 2012). *EVI-1* juega un papel importante en el desarrollo embrionario, regulando la hematopoyesis y la angiogénesis (Yuasa *et al.*, 2005) y también está implicado en muchas vías de señalización para la coexpresión y la coactivación de genes del ciclo celular (Wieser *et al.*, 2007). Se ha descrito en anteriores trabajos que la sobreexpresión de *EVI-1* está asociado con una enfermedad más agresiva en LMA (Lugthart *et al.*, 2008), cáncer de mama (Patel *et al.*, 2011), cáncer de ovario (Nanjundan *et al.*, 2007) y CCR (Deng *et al.*, 2011). Además, se ha identificado la sobreexpresión de *EVI-1* como un mecanismo que contribuye a la desregulación de SET en LMA. Cristóbal y colaboradores mostraron en su trabajo que existía una asociación significativa entre la sobreexpresión de *EVI-1* y la de SET, y que el

factor de transcripción regulaba a SET de manera positiva (Cristóbal *et al.*, 2012). De hecho, los autores demuestran mediante inmunoprecipitación de cromatina que EVI-1 se une al promotor de SET a través de varios sitios de unión. Sin embargo, los ensayos de luciferasa realizados incluyeron sitios que resultaron ser no funcionales, lo cual indica que los sitios funcionales serían otros diferentes a los incluidos en el estudio o bien que la regulación de EVI-1 sobre SET se produce de manera indirecta (Cristóbal *et al.*, 2012).

Regulación post-transcripcional: miR-199b

Un miR es un ARN de pequeño tamaño (entre 19 y 25 nucleótidos) que no codifica para proteínas. Su función está relacionada con la regulación de la expresión génica, ya que se une a secuencias específicas de regiones 3'UTR del ARN mensajero (ARNm) diana y reprime su traducción. Por lo tanto, los miRs pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumores en función del gen cuya traducción se esté reprimiendo (Kong *et al.*, 2012).

El miR-199b-5p se localiza en humanos en el cromosoma 9 y es un miR intragénico codificado dentro del gen *DNM1*. Sin embargo, la transcripción de este miR es independiente de la de su gen hospedador. Se ha demostrado que la baja expresión del miR-199b-5p juega un papel importante en la progresión del cáncer y desarrollo de metástasis y predice mal pronóstico en varios tipos tumorales, entre los que se encuentran cáncer de cabeza y cuello (Koshizuka *et al.*, 2017), cáncer de mama (Fang *et al.*, 2016), CCR (Cristóbal *et al.*, 2017), LMA (Favreau *et al.*, 2016), cáncer de vejiga (Sakaguchi *et al.*, 2017), CPCNP (Wang *et al.*, 2017) y tumor de Wilms (Zhao *et al.*, 2018). Por ello, este miR es considerado como un supresor tumoral. Por otra parte, el miR-199b-5p ha sido propuesto como un inhibidor de SET en coriocarcinoma (Chao *et al.*, 2010) así como implicado en la resistencia adquirida en cáncer de ovario (Liu *et al.*, 2014) y pacientes con leucemia mieloide crónica (Joshi *et al.*, 2014). Además, el miR-199b-5p también funciona como supresor tumoral en meduloblastoma a través de la regulación negativa de HES1 (Garzia *et al.*, 2009); en carcinoma hepatocelular y cáncer de próstata a través de HIF1 α (Wang *et al.*, 2011) y en cáncer de mama afectando a HER2 (Fang *et al.*, 2013). Asimismo, Li y sus colaboradores han descrito al miR-199b como un regulador positivo de eritropoyesis a través de la unión de los factores de transcripción GATA-1 y NF-E2 a su locus, que activan su transcripción. Además, los autores demuestran en su trabajo que el miR-199b también promueve la diferenciación eritropoyética mediante la represión de c-Kit (Li *et al.*, 2014). Por otro lado, un estudio reciente señala que la regulación de SIRT1, implicada en la acetilación de histonas, podría ser uno de los mecanismos por el cual el miR-199b ejerce su función supresora de metástasis (Shen *et al.*, 2016). Por tanto, todo lo anterior sugiere que este miR podría tener un impacto pronóstico en cáncer.

Regulación post-traducciona: SETBP1

La proteína SET es fosforilada principalmente sobre residuos de serina; sin embargo, también puede ser acetilada y glicosilada por TLL8 (Adachi *et al.*, 1994). Por otro lado, la digestión proteolítica es una importante manera de regular tanto la distribución como las funciones de SET (Nagata *et al.*, 1998).

El gen *SET binding protein 1* (*SETBP1*), originalmente llamado *SEB*, se localiza en el cromosoma 18, mapeando en 18q12.3. *SETBP1* codifica una oncoproteína de 1542 aminoácidos y 170 kDa localizada, principalmente, en el núcleo celular. Se ha demostrado que SETBP1 se une de manera directa a SET estabilizándolo (Cristóbal *et al.*, 2010), por lo que la sobreexpresión de SETBP1 previene la degradación de SET y conduce a la formación del heterodímero SETBP1-SET. Este heterodímero interacciona con PP2A formando el complejo SETBP1-SET-PP2A que resulta en la inhibición de PP2A (Cristóbal *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la sobreexpresión de SETBP1 se asocia con altos niveles de expresión de CIP2A en LMA, sugiriendo que la inhibición de PP2A ocurre a través de múltiples mecanismos en esta enfermedad (Lucas *et al.*, 2018). Además, se ha descrito previamente que las mutaciones que afectan a *SETBP1* producen un efecto de inhibición sobre PP2A similar al que se produce a través de su sobreexpresión (Piazza *et al.*, 2013). Las mutaciones con ganancia de función descritas para SETBP1 son principalmente las producidas en Glu858Lys, Asp868Asn/Tyr, Ser869Gly/Asn, Gly870Ser, Ile871Thr y Asp880Glu/Asn (Makishima *et al.*, 2013; Piazza *et al.*, 2013; Thol *et al.*, 2013). Por otro lado, las mutaciones en *SETBP1* pueden conducir a una disminución en la degradación de la proteína como consecuencia de la pérdida de la región *degron* (secuencia proteica que tiene un papel fundamental en la regulación de la degradación), lo cual podría ser funcionalmente equivalente a su sobreexpresión (Piazza *et al.*, 2013).

SET en cáncer

La proteína SET es un potente inhibidor de PP2A que juega un papel oncogénico modulando un gran número de rutas de señalización de gran relevancia en cáncer. Se ha descrito previamente que SET activa a los factores de transcripción AP-1 y c-Jun (Al-Murrani *et al.*, 1999), los cuales tienen una función importante en progresión y desarrollo de células tumorales (Kappelman *et al.*, 2014). Además, SET promueve la metástasis ya que se une a NM23H1, un supresor tumoral, formando un complejo que inhibe su función reparadora del ADN (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2003). Liu y colaboradores demuestran que el silenciamiento de SET disminuye de manera significativa la proliferación e invasión de células tumorales a través de la inhibición de la señalización de AKT y ERK (Liu *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que SET suprime la función de p53 a través de la acumulación de p-MDM2, una forma activa de MDM2 que regula

negativamente a p53 (Wei *et al.*, 2018). Otro aspecto importante de SET relacionado con cáncer es que esta oncoproteína es capaz de promover la migración celular a través de su unión a Rac-1 (ten Klooster *et al.*, 2007), la cual se ha descrito además como una GTPasa relacionada con TEM (Yoon *et al.*, 2017). La expresión de SET es elevada en células que se dividen de manera rápida, pero en células quiescentes o inhibidas por contacto la expresión de esta proteína es baja (Carlson *et al.*, 1998). Debido a esto, la sobreexpresión de SET ha sido correlacionada con la patogénesis de varios tipos tumorales, entre los que se incluye el CCR (Cristóbal *et al.*, 2014). Además, el silenciamiento de SET resensibiliza a las células de CCR a las terapias basadas en LOHP, lo cual sugiere que esta proteína podría estar jugando un papel importante en la resistencia adquirida a este fármaco (Cristóbal *et al.*, 2015). Los autores demuestran también que la desregulación de SET promueve la proliferación celular y la formación de colonosferas. Además, dicha desregulación es una alteración recurrente en pacientes con CCRm que predice mal pronóstico, ya que pacientes con sobreexpresión de la proteína presentan menores SLP y SG (Cristóbal *et al.*, 2015).

Como hemos dicho anteriormente, SET juega un papel vital promoviendo la tumorigénesis y la metástasis y desarrollando resistencias a las terapias convencionales. Por ello, se ha propuesto a SET como un potencial biomarcador que predice sensibilidad a fármacos (Cristóbal *et al.*, 2015; Leopoldino *et al.*, 2012). A su vez, se ha demostrado previamente que SET podría tener valor pronóstico y terapéutico en cáncer (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Switzer *et al.*, 2011; Christensen *et al.*, 2011).

FTY720 (Fingolimod) es un análogo de esfingosina empleado como inmunosupresor en pacientes con esclerosis múltiple (Brinkmann *et al.*, 2009). Sin embargo, diversos trabajos han mostrado que FTY720 tiene gran eficacia como agente antitumoral (Azuma *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2010). Cristóbal y colaboradores describen en su revisión que FTY720 tiene la habilidad de dañar el enlace SET-PP2A, produciendo un incremento de la actividad de PP2A (Cristóbal *et al.*, 2016). Sin embargo, esta droga es capaz de activar a PP2A a través de otros mecanismos, como por ejemplo, mediante la baja regulación de CIP2A o la hipofosforilación de PP2A en Y307 (Rincón *et al.*, 2015; Cristóbal *et al.*, 2015). Por otro lado, se han desarrollado compuestos derivados de FTY720, como OSU-2S, que tiene una mayor sensibilidad y especificidad así como menores toxicidades y efectos secundarios (Omar *et al.*, 2011). Sin embargo, existen otros análogos del FTY720, como el MP07-66, que carece de efectos inmunosupresores y presenta unos prometedores efectos antitumorales en leucemia linfocítica crónica (Zonta *et al.*, 2015). Por todo ello, FTY720 y derivados podrían tener una importante implicación terapéutica en cáncer permitiendo que pacientes con sobreexpresión de SET puedan beneficiarse del uso de esta droga en los protocolos antitumorales.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido:

1. **Estudiar el efecto de la desregulación del miR-199b en CCR.** Se ha demostrado que SET modula la sensibilidad de las células a los tratamientos con LOHP y 5-FU. Por tanto, analizaremos si la desregulación del miR-199b afecta también esta sensibilidad a través de la regulación negativa de SET. Además, examinaremos los efectos de su modulación ectópica en distintos procesos celulares. Estudiaremos el valor pronóstico y predictivo de respuesta del miR-199b en CCR y su asociación con parámetros clínicos y moleculares.
2. **Analizar SETBP1 como potencial mecanismo de regulación post-traducciona de SET en CCR.** Estudios anteriores en tumores líquidos han descrito que la sobreexpresión y las mutaciones con ganancia de función de *SETBP1* son eventos comunes que incrementan los niveles de SET, conduciendo a una mayor inactivación de PP2A. Por ello, analizaremos el perfil de expresión de SETBP1 en un amplio panel de líneas celulares y en muestras de pacientes de CCR. Estudiaremos la formación del complejo inhibitorio SETBP1-SET-PP2A y evaluaremos el estado mutacional de *SETBP1* en una cohorte de pacientes de CCR.
3. **Identificar nuevos biomarcadores relacionados con la ruta SET/PP2A en CCR.** Estudios anteriores sugieren que CAV-1 podría estar regulando invasión y metástasis celular a través del eje Rac-1/SET. Sin embargo, la expresión y función en la progresión del CCR no está clara. Por ello, analizaremos los niveles de expresión de esta proteína en una cohorte de pacientes con CCR. Evaluaremos la existencia de mecanismos moleculares que conduzcan a la desregulación de esta proteína.
4. **Evaluar el papel de SET en la progresión del CCR así como su expresión e impacto clínico en pacientes con CCR localizado.** Analizaremos la expresión de SET en una serie de pacientes con CCR localizado y su asociación con parámetros clínicos y moleculares. Investigaremos los efectos *in vitro* de la expresión ectópica de SET en migración, crecimiento con independencia de anclaje y TEM. Estudiaremos los mecanismos de inhibición de SET tanto en líneas celulares de CCR como en la cohorte de pacientes previamente mencionada.

RESULTADOS:
Publicaciones Científicas

ARTÍCULO 1: Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer

El miR-199b es un supresor tumoral que regula negativamente a SET y se asocia con mal pronóstico en algunos tipos tumorales. Sin embargo, sus niveles de expresión así como su potencial biológico y su significado clínico en CCR no han sido estudiados en profundidad. El inhibidor de PP2A SET ha mostrado tener unas prometedoras implicaciones terapéuticas y clínicas en CCR metastásico, pero los mecanismos moleculares que producen su desregulación son actualmente desconocidos.

En este trabajo mostramos la existencia de una baja regulación del miR-199b en 4 de las 5 líneas celulares de CCR que sobreexpresan SET, demostrando que existe una correlación inversa entre el miR-199b y la proteína. Además, el microRNA permite la activación de PP2A a través de la inhibición directa de SET, impidiendo la viabilidad celular y aumentando la sensibilidad de las células colorrectales a los tratamientos con LOHP.

Hemos encontrado una baja expresión del miR-199b en el 25% de los casos estudiados, y dicha alteración se asocia con metástasis linfática ($p=0.049$), presencia de metástasis sincrónica al diagnóstico ($p=0.026$) y sobreexpresión de SET ($p<0.001$). Así mismo, unos bajos niveles del miR-199b determinaron una menor SG ($p<0.001$), SLP ($p=0.003$) y predice un mayor beneficio en los tratamientos con LOHP. El impacto pronóstico de este microRNA es particularmente evidente en los subgrupos de pacientes con *KRAS* nativo y aquellos menor de 70 años. Los análisis multivariados han confirmado su impacto pronóstico independiente.

Con todo esto, nuestros resultados muestran que el miR-199b es un supresor tumoral cuya baja expresión determina mal pronóstico y emerge como un potencial mecanismo que contribuye a la inhibición de PP2A a través de la sobreexpresión de SET en el subgrupo de pacientes con CCR metastásico.

Aportación Personal al trabajo:

En este trabajo mi aportación se centró exclusivamente en colaborar en la parte de ejecución de los experimentos de viabilidad celular por MTS y de mantenimiento de los cultivos celulares y colonosferas. Además, colaboré en la realización de los ensayos de actividad fosfatasa y los de luciferasa. Finalmente, me encargué de parte de las extracciones de RNA de la serie estudiada y de un análisis preliminar en SPSS.

Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer

Ion Cristóbal^{1,*}, Cristina Caramés^{1,*}, Raúl Rincón¹, Rebeca Manso², Juan Madoz-Gúrpide², Blanca Torrejón¹, Paula González-Alonso², Federico Rojo² and Jesús García-Foncillas¹

¹Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", E-28040 Madrid, Spain

²Pathology Department, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", Autonomous University of Madrid, E-28040 Madrid, Spain

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Ion Cristóbal, email: ion.cristobal@fjd.es
Jesús García-Foncillas, email: jgfoncillas@gmail.com
Federico Rojo, email: frojo@fjd.es

Keywords: miR-199b, SET, PP2A, prognosis, therapy

Received: November 02, 2015

Accepted: July 17, 2016

Published: August 10, 2016

Copyright: Cristóbal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The tumor suppressor microRNA-199b (miR-199b) is a negative SET regulator associated with poor outcome in some human cancers. However, its expression levels as well as potential biological and clinical significance in colorectal cancer (CRC) remain completely unexplored. The PP2A inhibitor SET has shown promising therapeutic and clinical implications in metastatic CRC (mCRC) but the molecular mechanisms underlying SET deregulation are currently unknown. We show here miR-199b downregulation in 4 out of 5 CRC SET-overexpressing cell lines and its inverse correlation with SET overexpression in CRC patients. Moreover, miR-199b led to PP2A activation through a direct SET inhibition, impaired cell viability and enhanced oxaliplatin sensitivity in CRC cells. MiR-199b was found downregulated in 25% of cases, and associated with lymph metastasis ($p = 0.049$), presence of synchronous metastasis at diagnosis ($p = 0.026$) and SET overexpression ($p < 0.001$). Furthermore, low miR-199b levels determined shorter overall ($p < 0.001$), progression-free survival ($p = 0.003$) and predicted clinical benefit to oxaliplatin treatment. The miR-199b prognostic impact was particularly evident in both younger and KRAS wild-type subgroups. Multivariate analyses confirmed its independent prognostic impact. Altogether, our results show that miR-199b is a tumor suppressor whose downregulation independently determines worse outcome and emerges as a potential contributing mechanism to inhibit PP2A via SET overexpression in a subgroup of mCRC patients.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) represents the third most commonly diagnosed cancer and the fourth highest cause of cancer-related deaths worldwide [1]. Although the CRC stage at diagnosis is the most predictive factor of clinical outcome, more than 70% of CRC cases newly diagnosed have a surgically resectable localized disease [2]. However,

the remaining 20–30% of newly diagnosed CRC patients with unresectable distant metastasis together with a substantial proportion of cases who develop metachronous metastasis represents the subgroup of patients with worst outcome [3]. Therefore, it remains necessary to improve our molecular knowledge of CRC to identify alterations with both prognostic and predictive value of therapy efficacy to develop novel and more efficient targeted therapies.

The protein phosphatase 2A (PP2A) is a well-known tumor suppressor that inhibits signaling pathways critical in human cancer [4, 5]. Several works highlighting the molecular and clinical significance of PP2A inhibition in CRC have been reported [6–9]. The protein SET is a potent endogenous PP2A inhibitor [10] involved in many cell functions [11–15] and a novel proposed target for anticancer therapy [16]. Interestingly, some evidences suggest that SET could be relevant in CRC progression [17]. In fact, our group has recently reported that SET deregulation determines poor outcome and defines a subgroup of metastatic CRC patients who could benefit from therapies containing PP2A activators [18]. MicroRNAs (miRs) are small non-coding RNAs that inhibit specific target genes by translation repression and they then can function as oncogenes or tumor suppressors in human cancer. MiR-199b is a SET inhibitor [19, 20] which has also been involved in acquired chemoresistance in chronic myeloid leukaemia or ovarian cancer [21, 22]. Moreover, miR-199b also functions as a tumor suppressor in medulloblastoma, hepatocellular carcinoma and breast cancers by affecting targets such as HEIS1, HIF1 α or HER2 [23–25]. However, its status and potential significance in colorectal cancer is completely unknown.

In this report, we identified miR-199b downregulation as a common alteration with high clinical relevance that represents a potential contributing mechanism to SET overexpression in metastatic CRC patients. Interestingly, low miR-199b levels inversely correlated with SET expression and independently predicted shorter overall and progression-free survival defining a subgroup of metastatic CRC patients with very poor outcome candidate to be treated with SET/PP2A targeting drugs such as FTY720.

RESULTS

MiR-199b is downregulated and affects SET expression and PP2A activation status in CRC cells

We quantified miR-199b in 5 different CRC cell lines, observing low miR-199b levels in 4 out of the 5 CRC cell lines compared to normal colonic mucosa (Supplementary Table S1). Moreover, western blot analysis showed SET overexpression in the same 5 CRC cell lines (Figure 1A). The same normal controls were used in both experiments. We first performed luciferase assays to validate the role of miR-199b as a negative SET regulator in CRC. Transfection of pSET-3'UTRwt in SW480 cells ectopically expressing miR-199b showed decreased luciferase activity, indicating that miR-199b binds to the SET 3'UTR, negatively regulating its expression. Analysis using the same construct with the mutated miR-199b seed region showed no changes in luciferase activity, confirming that miR-199b directly binds

to SET (Supplementary Figure S1). We next assessed the effects of miR-199b modulation on SET expression in SW480 cells using pre- and anti-microRNAs specific for miR-199b. As expected, we found decreased and increased SET levels in SW480 cells transfected with pre- and anti-miR-199b, respectively (Figure 1B). Similar results were obtained using HT-29 cells (Supplementary Figure S2A).

Due to SET is an endogenous PP2A inhibitor and miR-199b negatively regulates SET, we analyzed whether miR-199b deregulation could modulate PP2A in CRC cells. As expected, we observed PP2A activation in both SW480 and HT-29 cells after pre-miR-199b transfection. Although transfection with anti-miR-199b induced PP2A inhibition significance was only achieved in HT-29 cells. (Figure 1C and Supplementary Figure S2B). These results prompted us to analyze SET and miR-199b expression levels in a cohort of 97 patients with metastatic CRC. Patient characteristics are presented in Supplementary Table S2. Interestingly, a negative correlation was found between miR-199b and SET expression (Supplementary Figure S3). Moreover, significant lower miR-199b was significantly downregulated in the subgroup of patients with SET overexpression (Figure 1D), suggesting that altered expression miR-199b is a molecular mechanism that contributes to deregulate SET and PP2A activation status in CRC patients.

MiR-199b impairs cell viability in a SET-dependent manner

To investigate its biological relevance as a potential tumor suppressor in CRC, we assessed the effects of miR-199b modulation on cell growth. Interestingly, we observed a reduced proliferation in SW480 cells transfected with a pre-miR-199b in comparison with those transfected with a negative control (Figure 2A). These results were confirmed with the HT-29 cell line (Supplementary Figure S4A). However, only slight effects on cell growth were found by anti-miR-199b in SW480 and HT-29 cells (Figure 2B and Supplementary Figure S4B). Of importance, we also observed that ectopic expression of SET significantly restored cell proliferation in SW480 cells transfected with pre-miR-199b (Figure 2C). Similar results were found in HT-29 cells (Supplementary Figure S4C). Altogether, these results would indicate that SET regulation is a key event which mediates miR-199b-induced antitumor effects in CRC.

MiR-199b sensitizes CRC cells to oxaliplatin and 5-FU treatments

We next investigated the potential therapeutic role of miR-199b affecting sensitivity of CRC cells to standard chemotherapy drugs such as oxaliplatin and 5-FU. Interestingly, we found that miR-199b-overexpressing SW480 cells showed higher sensitivity

to oxaliplatin treatment. These results were confirmed in the HT-29 cell line (Figure 3A). Similarly, we observed an enhanced sensitivity to 5-FU treatment in both SW480 and HT-29 cells transfected with pre-miR-199b (Figure 3B). In order to assess whether miR-199b affects oxaliplatin sensitivity through SET inhibition, we modulated SET expression in oxaliplatin treated SW480 and HT-29 cells ectopically expressing miR-199b. Interestingly, we observed that SET overexpression was able to restore oxaliplatin sensitivity (Supplementary Figure S5), suggesting that miR-199b regulates oxaliplatin sensitivity in CRC cells through a SET negative regulation.

Prevalence of miR-199b downregulation in metastatic colorectal cancer and its association with molecular and clinical parameters

In order to investigate whether miR-199b is deregulated in CRC patients, we analyzed miR-199b

expression levels in a cohort of 97 patients with metastatic CRC. Mir-199b was found downregulated in 24 of 97 cases (24.7%). Patient characteristics are presented in Table S2. Interestingly, we found low miR-199b expression associated with development of lymph metastasis (37.9% versus 19.1%, $p = 0.049$), presence of synchronous metastasis at diagnosis (32.8% versus 12.8%, $p = 0.026$) and SET overexpression (53.1% versus 10.8%, $p < 0.001$). Association between miR-199b downregulation and molecular and clinical parameters are included in Table 1. Interestingly, we observed miR-199b downregulated in 17 out of 32 cases with SET overexpression, suggesting that low miR-199 is a relevant contributing alteration to deregulate SET in a subgroup of CRC patients. Of importance, these findings would also indicate the existence of alternative mechanisms in those SET-overexpressing cases without miR-199b downregulation that should have to be elucidated in future studies.

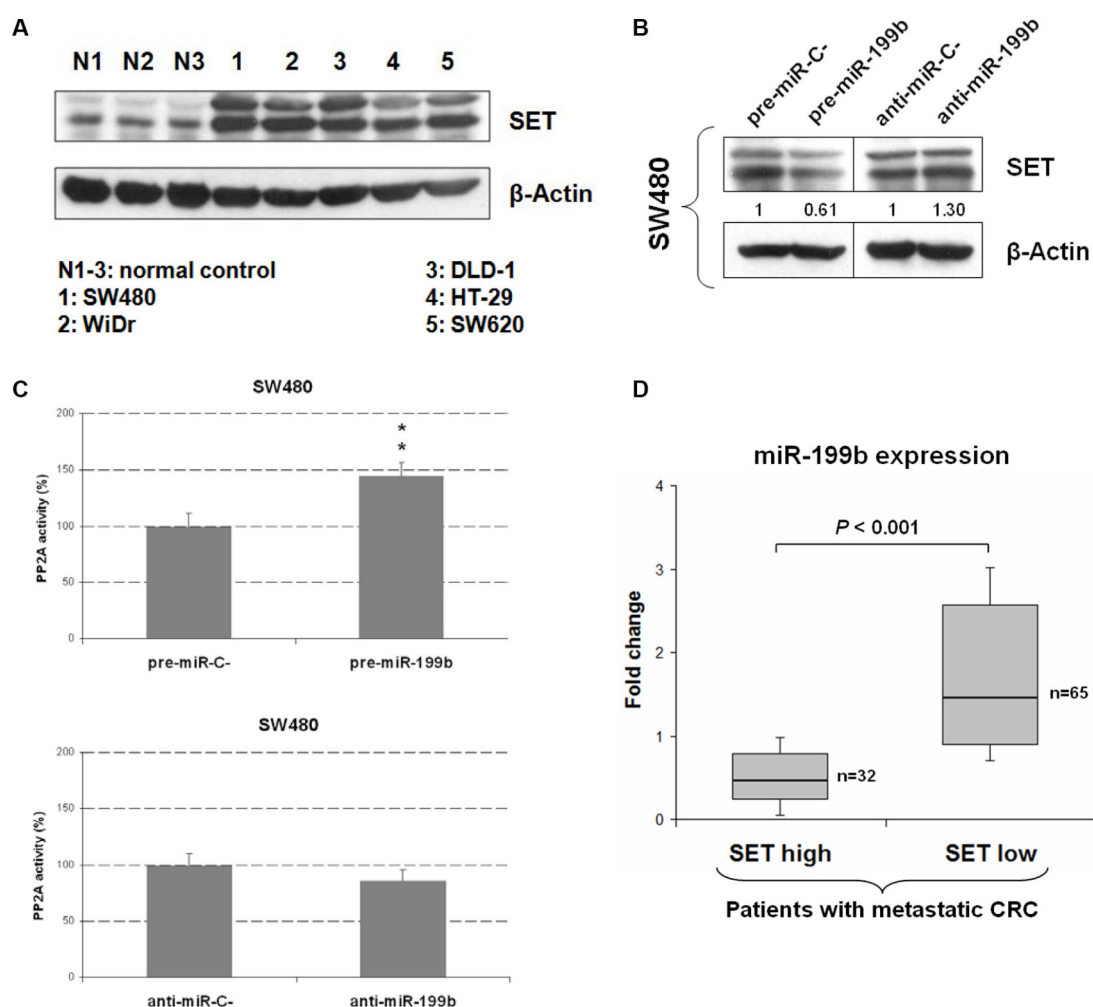


Figure 1: MiR-199b downregulation is a common alteration in mCRC that regulates SET and PP2A activity (A) Western blot analysis showing SET expression levels in 5 CRC cell lines. (B) Western blot analysis showing SET expression in SW480 cells transfected with pre- or anti-miR-199b; (C) PP2A assays showing changes in PP2A activity in SW480 cells after transfection with pre- or anti-miR-199b. Data represented are mean of three independent experiments \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; (D) Box-plot showing miR-199b expression levels in patients with ($N = 35$) and without ($N = 62$) SET overexpression; N1-3: normal controls.

Table 1: Association between miR-199b and clinical and molecular parameters in 97 patients with metastatic CRC

	No. Cases	High miR-199b (%)	Low miR-199b (%)	<i>P</i>
miR-199b	97	73 (75.3)	24 (24.7)	
Sex	97	73	24	0.830
Male	67	50 (74.6)	17 (25.4)	
Female	30	23 (76.7)	7 (23.3)	
Age	93	71	22	0.079
< 70	44	30 (68.2)	14 (31.8)	
≥ 70	49	41 (83.7)	8 (16.3)	
ECOG	92	71	21	0.175
0–2	75	60 (80)	15 (20)	
3–4	17	11 (64.7)	6 (35.3)	
Site of primary tumor	97	73	24	0.524
Colon	72	53 (73.6)	19 (26.4)	
Rectum	25	20 (80)	5 (20)	
Synchronous metastasis	97	73	24	0.026
No	39	34 (87.2)	5 (12.8)	
Yes	58	39 (67.2)	19 (32.8)	
Number of metastatic sites	97	73	24	0.383
1–2	89	68 (76.4)	21 (23.6)	
> 2	8	5 (62.5)	3 (37.5)	
Liver metastasis	97	73	24	0.282
No	33	27 (81.8)	6 (18.2)	
Yes	64	46 (71.9)	18 (28.1)	
Lung metastasis	97	73	24	0.264
No	68	49 (84.5)	19 (15.5)	
Yes	29	24 (82.8)	5 (17.2)	
Lymph metastasis	97	73	24	0.049
No	68	55 (80.9)	13 (19.1)	
Yes	29	18 (62.1)	11 (37.9)	
Peritoneal metastasis	97	73	24	0.173
No	78	61 (78.2)	17 (21.8)	
Yes	19	12 (63.2)	7 (36.8)	
MSI	95	71	24	0.617
No	89	66 (74.2)	23 (25.8)	
Yes	6	5 (83.3)	1 (16.7)	
KRAS mutated	97	73	24	0.755
No	58	43 (74.1)	15 (25.9)	
Yes	39	30 (76.9)	9 (23.1)	
SET overexpression	97	73	24	< 0.001
No	65	58 (89.2)	7 (10.8)	
Yes	32	15 (46.9)	17 (53.1)	

Table 2: Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 97 patients with mCRC

	Univariate OS analysis				Multivariate OS Cox analysis			
	HR	95% CI		Significance	HR	95% CI		Significance
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Age				0.363				—
< 70	1.00							
≥ 70	1.29	0.74 to 2.25			—	—		
Gender				0.227				—
Male	1.00							
Female	0.69	0.38 to 1.25			—	—		
Synchronous				0.096				—
No	1.00							
Yes	1.66	0.91 to 3.02			—	—		
ECOG				< 0.001				< 0.001
0–2	1.00				1.00			
3–4	2.04	1.46 to 2.84			1.86	1.32 to 2.62		
Number of metastatic sites				0.589				—
1–2	1.00							
> 2	1.13	0.71 to 1.80			—	—		
MiR-199b downregulation				< 0.001				0.003
No	1.00				1.00			
Yes	3.46	1.88 to 6.38			2.72	1.41 to 5.24		

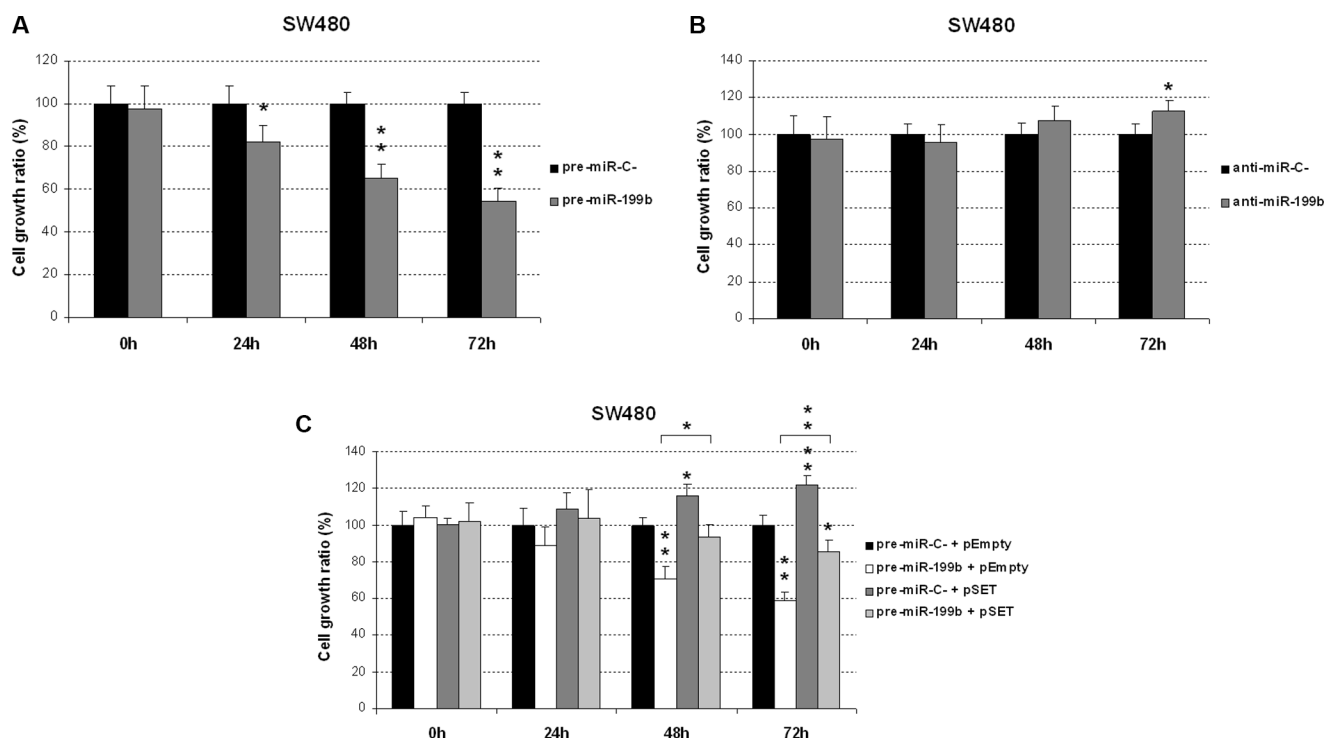


Figure 2: MiR-199b impairs cell proliferation in CRC cells. MTS assay showing proliferation in SW480 cells transfected with pre-miR-199b (A), anti-miR-199b (B) or both SET and pre-miR-199b (C). Data represented are mean of three independent experiments \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Clinical significance of miR-199b downregulation in metastatic colorectal cancer

We next investigated the potential clinical significance of miR-199b in mCRC. Clinical follow-up data were available for all the 97 patients included in the study, 67 male and 30 female, with a median of age of 70 years (range: 40–89). The median OS of the global cohort was 25.3 months (95% confidence interval (CI): 16.2–34.4). Of relevance, we found that those patients with low miR-199b expression showed a substantially shorter OS (median OS, 9.7 versus 30 months, $p < 0.001$) (Figure 4A) and PFS (median PFS, 8.6 versus 15.4 months, $p = 0.003$) (Figure 4B).

We next stratified our cohort by *KRAS* mutation status, observing that miR-199b shows higher prognostic value in those patients with wild-type *KRAS* (median OS, 8.6 versus 30 months, $p = 0.001$; median PFS, 5.8 versus 15.4 months, $p = 0.017$) than in those cases with mutated *KRAS* (median OS, 13.5 versus 31.5 months, $p = 0.032$; median PFS, 8.7 versus 12.6 months, $p = 0.080$) (Figure 5). Moreover, miR-199b had significant prognostic value in OS in both subgroups of patients younger (median OS, 11.9 versus 34.2 months, $p = 0.003$) and older than 70 years (median OS, 3.9 versus 26.9 months, $p = 0.002$). Although miR-199b predicted PFS in younger patients (median PFS, 9.7 versus 22.5 months, $p = 0.009$), significance in PFS was not achieved in the subgroup of elderly cases (median PFS, 3.8 versus 12 months, $p = 0.119$) (Supplementary Figure S6). Importantly, we observed that miR-199b downregulation was predictive of clinical benefit in those patients who received oxaliplatin-based

chemotherapy ($N = 39$; $p = 0.018$) (Table S3). Of relevance, multivariate analysis demonstrated that ECOG and miR-199b downregulation have an independent prognostic value in our patient cohort in both OS (Table 2) and PFS (Supplementary Table S4). Additionally, we also analyzed the clinical significance of the PP2A inhibitor SET in our series. Immunohistochemical detection of SET is shown in Supplementary Figure S4. As expected, we confirmed that those patients with SET overexpressed showed a substantially shorter OS (median OS, 9.9 versus 31.5 months, $p < 0.001$) and PFS (median PFS, 8.7 versus 18.5 months, $p = 0.009$) (Supplementary Figure S7).

Furthermore, we analyzed miR-199b levels in primary and paired liver metastatic tissues from 10 CRC patients in order to investigate the potential significance of miR-199b in CRC cell metastasis development. We quantified miR-199b levels using Taqman Low Density Arrays (TLDA) panel A (Applied Biosystems). Interestingly, we found lower miR-199b levels in liver metastatic tissues compared to their paired primary CRC tissues ($p = 0.047$) (Supplementary Figure S8). Altogether, these preliminary results suggest that miR-199b overexpression could be playing a role in CRC liver metastasis development. Finally, we analyzed the potential role of miR-199b deregulation on *CD133* expression. We generated colonosphere-derived cells from the DLD-1, SW480 and HT-29 cell lines in which we observed *CD133* enrichment together with miR-199b downregulation (Supplementary Figure S9A). Although 3-fold increase in *CD133* expression was observed in DLD-1 colonospheres no expression of miR-199b was detected, similarly than in DLD-1 parental cells (data not shown). In addition, CD133

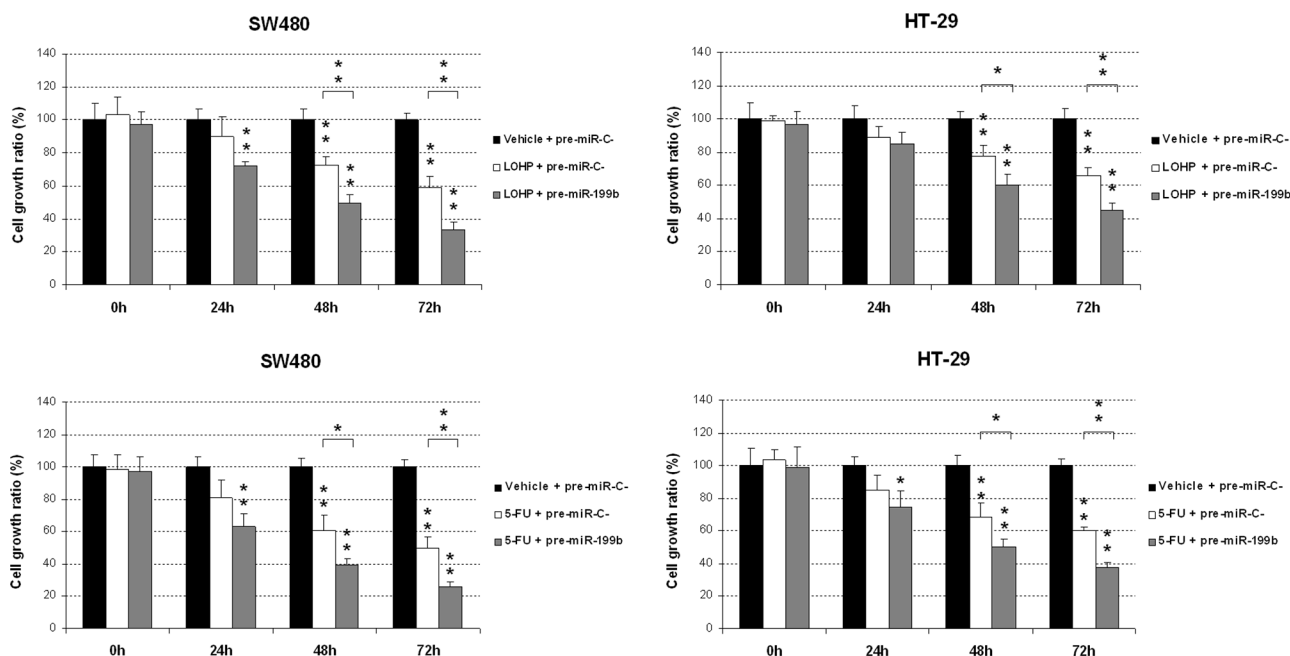


Figure 3: MiR-199b sensitizes CRC cells to oxaliplatin and 5-FU treatments. MTS assays showing the effect of miR-199b in the sensitivity to oxaliplatin (A) or 5-FU (B) in SW480 and HT-29 cells; Data represented are mean of three independent experiments \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

expression could be quantified in 64 CRC patients from our cohort with enough material available. Interestingly, we found that miR-199b and *CD133* expression show a negative correlation (Supplementary Figure S9B), further suggesting that miR-199b deregulation could be affecting the *CD133* expression status of CRC cells.

DISCUSSION

Our group has recently reported that SET overexpression is a marker of poor outcome in metastatic CRC patients which defines a subgroup of patients candidate to be treated with PP2A activating drugs [18]. However, how SET deregulation occurs in CRC remains fully unknown. We then evaluated molecular causes that could lead to SET overexpression in CRC, analyzing whether an altered expression of miR-199b could be involved in SET deregulation in CRC. Thus, we first quantified miR-199b in 5 CRC cell lines previously reported to have SET overexpression [6], observing that miR-199b was downregulated in 4 out of 5 cases. This observation together with the significant lower miR-199b expression found in the subgroup of SET-overexpressing mCRC patients suggest a role of miR-199b in SET-mediated PP2A inhibition in CRC. This issue was further supported by the decrease in SET levels together with PP2A activation observed after miR-199b overexpression in CRC cell lines. Of note, the transfection with anti-miR-199b only promoted a slight reduction in PP2A activity probably due to the low basal miR-199b expression together with the SET overexpression status in both SW480 and HT-29 cells. These findings are in concordance with the fact that anti-miR-199b only induced a discrete increase of cell viability whereas miR-199b

overexpression led to a marked reduction of cell growth. Moreover, the antitumor effects of miR-199b on cell growth is probably due to its role as negative SET regulator since the co-expression of miR-199b together with SET almost totally restored proliferation of CRC cells. Thus, miR-199b emerges as a novel tumor suppressor in CRC and its downregulation is a common alteration which contributes to PP2A inhibition in this disease.

Furthermore, miR-199b has been reported to be involved in acquired resistance to different antitumor therapies in human cancer such as imatinib in chronic myeloid leukemia [21], cisplatin in ovarian cancer [22] or trastuzumab in breast cancer [25]. Thus, we evaluated whether miR-199b could affect we observed that miR-199b sensitize CRC cells to both oxaliplatin and 5-FU treatments. These findings are concordant with the fact that miR-199b negatively regulates SET, which has been described to modulate resistance to oxaliplatin and 5-FU treatments in CRC [18].

Despite some data in the literature describe miR-199b tumor suppressor roles in human cancer [20–25], nothing is known about its function in CRC. As indicated above, miR-199b has been reported to have prognostic value in hepatocellular and papillary thyroid carcinomas [24, 26]. Therefore and considering that miR-199b seems to be a molecular cause of SET overexpression in a subgroup of metastatic CRC patients, we hypothesized that miR-199b downregulation could have clinical impact in metastatic CRC. Of importance, miR-199b downregulation determined poor outcome and clinical benefit in those cases treated with oxaliplatin-based chemotherapy. This observation is in concordance with our *in vitro* results and further supports that miR-199b increases sensitivity to oxaliplatin in CRC cells.

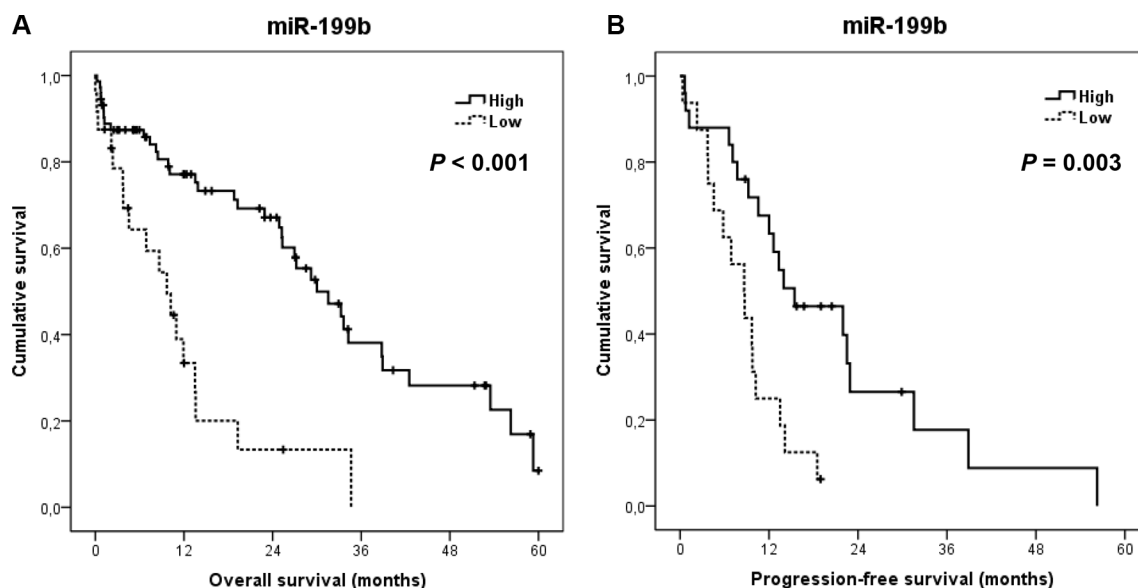


Figure 4: Clinical significance of miR-199b expression levels in metastatic CRC. Kaplan-Meier analyses of overall survival (A) and progression-free survival (B) in a cohort of 97 metastatic CRC patients.

The *KRAS* mutation status is a key molecular factor in determining clinical benefit to cetuximab in CRC [27]. Therefore, we evaluated the clinical impact of miR-199b stratifying our cohort by the presence or not of *KRAS* mutations. Thus, we found that miR-199b downregulation showed higher prognostic impact in both OS and PFS in the *KRAS* wild type subgroup. These findings could have a potential therapeutic relevance since FTY720, a PP2A-activating drug that binds and blocks SET [28], has recently shown to resensitize CRC cell to cetuximab [29] and our results suggest that miR-199b could be playing a role via SET regulation.

In addition to SET, miR-199b has been reported to regulate other important targets such as HEIS1, HIF1 α or HER2 in medulloblastoma, hepatocellular carcinoma and breast cancers [23–25]. Among those metastatic

CRC patients without SET overexpression, we observed miR-199b downregulated in 7 out of 65 cases. Of importance, we observed that miR-199b downregulation determined substantially shorter OS in these patients (median OS, 11 versus 31.5 months, $p = 0.052$), although significance was not achieved probably by the low number of cases studied. Therefore, these observations would indicate a potential SET-independent prognostic value for miR-199b which needs to be further confirmed in forthcoming studies. Moreover, multivariate analyses demonstrated that miR-199b downregulation was an unfavorable independent factor associated with OS and PFS in mCRC, which further confirm its prognostic value in this disease.

In concordance with previous observations in medulloblastoma [23], we show lower miR-199b

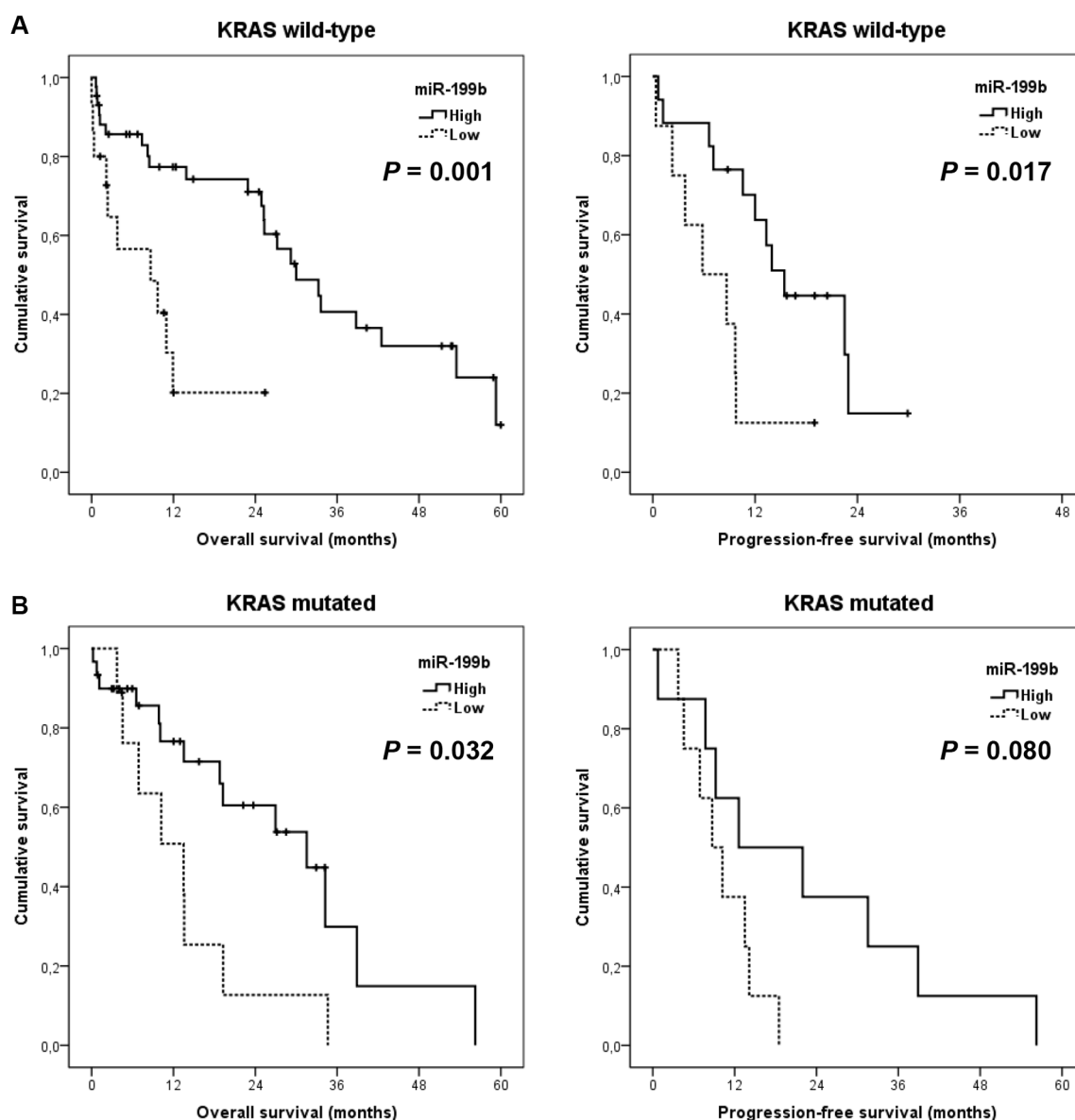


Figure 5: Prognostic impact of miR-199b in metastatic CRC patients stratified by *KRAS* mutation status. Kaplan-Meier analyses of overall survival and progression-free survival in *KRAS* wild type ($N = 58$) (A) and *KRAS* mutated subgroups ($N = 39$) (B).

expression in CRC with metastatic disease. In their work, Garzia et al. provided relevant findings supporting that miR-199b downregulation in metastatic medulloblastoma cells was probably due to a methylation-based epigenetic regulation of this microRNA. Therefore, it remains necessary to evaluate in future investigations whether a similar mechanism of transcriptional regulation is also occurring in CRC cells. On the other hand, the Notch signaling pathway plays a relevant role in self-renewing processes and its inhibition has been described to decrease CD133+ tumor cells [23, 30]. Of importance, a negative feedback loop of regulation has been reported between miR-199b and HES1, a key Notch effector, then impairing the CD133+ stem cell-like subpopulation of tumor cells [23, 31]. Interestingly, we show here that miR-199b is downregulated after colonosphere generation, which are CD133-enriched cells. Moreover, we analyzed *CD133* in 64 metastatic CRC patients observing a negative correlation between *CD133* and miR-199b. These results would indicate a potential relationship between miR-199b and CD133 in CRC cells that needs to be further explored in forthcoming studies.

In conclusion, our results show that miR-199 downregulation is a frequent alteration in metastatic CRC that emerges as a novel therapeutic target and a contributing mechanism to SET overexpression in this disease. Interestingly, our findings indicate that miR-199 downregulation is a common event that plays an oncogenic role in CRC cells. Moreover, this alteration has an independent prognostic value predicting poor outcome in metastatic CRC patients and could have important therapeutic implications via SET-dependent PP2A inhibition in metastatic CRC.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and transfection

The human CRC cell lines SW480 (ATCC CCL-228), WiDr (ATCC CCL-218), DLD-1 (ATCC CCL-221), HT-29 (ATCC HTB-38) and SW620 (ATCC CCL-227) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Authentication was done by the authors in all cases (LGC Standards). Cell lines were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum and were grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Media were supplemented with penicillin G (100 U/ml), and streptomycin (0.1 mg/ml). Cells were treated with oxaliplatin (LOHP) (1 µM) (Sigma), 5-fluorouracil (5-FU) (1 µM) (Sigma) and FTY720 (10 µM) (Calbiochem) as previously reported [6, 9]. For transfection experiments, CRC cells were seeded in 6-well plates and transfected with 10 µl of Lipofectamine 2000 (Life Technologies) and 2 µg of SET plasmidic vector or 20 nM of a miR-199b specific *mirVana*TM miRNA Mimic and Inhibitor (Ambion).

Patient samples

Primary colorectal tissues were surgical resection specimens from CRC tumors obtained from Fundación Jiménez Díaz Biobank (BFJD, Madrid). The study comprised consecutive FFPE tumor samples of 97 patients with metastatic CRC that were retrospectively selected from 2001 to 2012 according to the following criteria: adenocarcinoma, operable disease, no neoadjuvant therapy, enough available tissue, clinical follow-up data and metastatic disease. TNM (Tumor, Node, Metastases) staging was classified using the 7th American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for colorectal cancer. Clinical data were collected from medical clinical records by oncologists. KRAS mutational status was determined by Cobas KRAS Mutation Test kit (Roche Molecular Diagnostics) following manufacturer's procedures. Tissue microarrays (TMA) were constructed. Representative areas of each tumor were carefully selected and three tissue cores (1 mm diameter) were obtained using a TMA workstation (T1000 Chemicon). Samples were taken anonymously. The ethical committee and institutional review board approved the project.

Western blot analysis

Protein extracts were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following manufacturer's indications, clarified (12,000 × g, 15 min, 4°C), denatured and subjected to SDS-PAGE and Western-blot. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-SET (Abcam) and mouse monoclonal anti-βactin (Sigma). Proteins were detected with the appropriate secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) by chemiluminescence using Tropix CSPD and Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems).

Cell viability assay

Cell proliferation was measured in triplicate wells by MTS assay in 96-well plates using the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), following the manufacturer's indications.

PP2A phosphatase activity assay

PP2A assays were performed with cell lysates (50 µg) using a PP2A immunoprecipitation phosphatase assay kit (Millipore) as previously described [6].

Immunohistochemistry

Tissue sections (3 µm) were placed on plus charged glass slides. After deparaffinization in xylene and graded alcohols, heat antigen retrieval was performed in pH9 EDTA-based buffer (Dako). Endogenous peroxidase was blocked by 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides

were incubated with same primary antibody against SET as described for 60 minutes at room temperature, followed of appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (Flex+, Dako). Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. All stainings were performed in a Dako Autostainer. Sections incubated with normal non-immunized rabbit immunoglobulins were used as negative controls. As positive control, a section of colorectal tumor with known expression of SET was used. SET antibody sensitivity (1:5000) had been calculated in a range of crescent dilutions of primary antibody. Specificity was confirmed in a set of paired fresh frozen and FFPE samples were processed by western blot and IHC. Only the membrane of epithelial cells, but not stromal cells, was evaluated for SET expression blinded to clinical data by two pathologists. A semiquantitative histoscore was calculated by estimation of the percentage of tumor cells positively stained with low, medium, or high staining intensity. The final score was determined after applying a weighting factor to each estimate. The following formula was used: $\text{histoscore} = (\text{low } \%) \times 1 + (\text{medium } \%) \times 2 + (\text{high } \%) \times 3$ and the results ranged from 0 to 300.

Quantification of miRNA expression levels

Total RNA was isolated using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion) according to manufacturer's instructions. Samples were reverse transcribed using the TaqManHMicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and mature miRNAs were quantified by quantitative real-time RT-PCR using TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) specific for miR-199b (miR-199b-5p_000500) and U6B as internal control. Analysis of relative gene expression data was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [32]. The mean expression value of the global cohort ($\Delta C_{T\text{cohort}}$) was used to obtain the relative expression of each sample ($\Delta\Delta C_T$) and the fold change calculated as $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Downregulation of miR-199b was considered when the expression in a sample was lower than mean minus SD of the patient cohort, corresponding to 0.378 fold change.

Luciferase assays

Luciferase assays were done using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) following the manufacturer's instructions. SW480 cells were transfected with 20 nM of pre-miR-199b (Ambion) and a pmiR-Glo construct empty or including the SET 3'UTR with the wild type or mutated miR-199b seed region. Firefly luciferase activities were normalized to Renilla luciferase activities.

Colonospheres

We generated colonosphere-derived cells from DLD-1, SW480 and HT-29 cells using 6-well ultra-low

attachment plates (Corning) and 10,000 cells per well. Cells were grown in serum-free DMEM/F12 supplemented with GlutMAX™-I (Gibco) 1% N2 (Gibco), 2% B27 (Gibco), 20 ng/ml human FGF (Sigma) and 50 ng/ml EGF (Sigma). After 7 days, plates were analyzed for colonosphere formation.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 20 for windows (SPSS Inc, Chicago Illinois). Overall survival (OS) was defined as the time from the date of surgery to the date of death from any cause or last follow-up. Progression-free survival (PFS) was defined as the time from surgery until any primary, regional or distant recurrence, appearance of a secondary tumor or death. Kaplan-Meier method and survival comparisons were done with the log-rank test if proportional hazard assumption was fulfilled and Breslow otherwise. The Cox proportional hazards model was adjusted taking into consideration significant parameters in univariate analysis. A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Receiver operating curve (ROC) was used to determine the optimal cutoff point based on progression end point for SET expression as previously described method to calculate threshold values for biomarker analysis [33–35]. Following this criteria, high SET expression was considered when Hscore in tumor cells were equal or higher than 100. This work was carried out in accordance with Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) guidelines [36].

ACKNOWLEDGMENTS

None.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by PI13/02609 and PI15/00934 grants from Instituto de Salud Carlos III. BT and PG-A are supported by Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61:69–90.
2. Lombardi L, Morelli F, Cinieri S, Santini D, Silvestris N, Fazio N, Orlando L, Tonini G, Colucci G, Maiello E. Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36:S34–41.

3. Gill S, Blackstock AW, Goldberg RM. Colorectal cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82:114–29.
4. Mumby M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell.* 2007; 130:21–4.
5. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med.* 2008; 14:152–60.
6. Cristobal I, Manso R, Rincon R, Carames C, Senin C, Borrero A, Martínez-Useros J, Rodriguez M, Zazo S, Aguilera O, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:938–47.
7. Carmen Figueroa-Aldariz M, Castañeda-Patlán MC, Santoyo-Ramos P, Zentella A, Robles-Flores M. Protein phosphatase 2A is essential to maintain active Wnt signaling and its A β tumor suppressor subunit is not expressed in colon cancer cells. *Mol Carcinog.* 2014; 54:1430–41.
8. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Zazo S, Del Pulgar TG, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014; 111:756–62.
9. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Madoz-Gúrpide J, Caramés C, del Puerto-Nevado L, Rojo F, García-Foncillas J. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842:1823–9.
10. Li M, Makkinje A, Damuni Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1996; 271:11059–62.
11. Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell.* 2001; 104:119–30.
12. ten Klooster JP, Leeuwen I, Scheres N, Anthony EC, Hordijk PL. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *Embo J.* 2007; 26:336–45.
13. Canela N, Rodriguez-Vilarrupla A, Estanyol JM, Diaz C, Pujol MJ, Agell N, Bachs O. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem.* 2003; 278:1158–64.
14. Trotta R, Ciarlariello D, Dal Col J, Allard J 2nd, Neviani P, Santhanam R, Mao H, Becknell B, Yu J, Ferketich AK, Thomas B, Modi A, Blaser BW, et al. The PP2A inhibitor SET regulates natural killer cell IFN- γ production. *J Exp Med.* 2007; 204:23397–405.
15. Cervoni N, Detich N, Seo SB, Chakravarti D, Szyf M. The oncoprotein Set/TAF-I β , an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem.* 2002; 277:25026–31.
16. Switzer CH, Cheng RY, Vitek TM, Christensen DJ, Wink DA, Vitek MP. Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene.* 2011; 30:2504–13.
17. Dong L, Zhu J, Wen X, Jiang T, Chen Y. Involvement of SET in the Wnt signaling pathway and the development of human colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2014; 7:1203–8.
18. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Caramés C, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Deregulation of the PP2A Inhibitor SET Shows Promising Therapeutic Implications and Determines Poor Clinical Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:347–56.
19. Chao A, Tsai CL, Wei PC, Hsueh S, Chao AS, Wang CJ, Tsai CN, Lee YS, Wang TH, Lai CH. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett.* 2010; 291:99–107.
20. Cristóbal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, Cortes-Lavaud X, García-Sánchez MA, Calasanz MJ, Otero MD. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2012; 97:543–50.
21. Joshi D, Chandrakala S, Korgaonkar S, Ghosh K, Vundinti BR. Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients. *Gene.* 2014; 542:109–12.
22. Liu MX, Siu MK, Liu SS, Yam JW, Ngan HY, Chan DW. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget.* 2014; 5:944–58. doi: 10.18632/oncotarget.1458.
23. Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, Esposito V, Galeone A, Navas L, Esposito S, Gargiulo S, Fattet S, Donofrio V, et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One.* 2009; 4:e4998.
24. Wang C, Song B, Song W, Liu J, Sun A, Wu D, Yu H, Lian J, Chen L, Han J. Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26:1630–7.
25. Fang C, Zhao Y, Guo B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2013; 114:1457–63.
26. Peng Y, Li C, Luo DC, Ding JW, Zhang W, Pan G. Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules.* 2014; 19:11586–99.
27. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1757–65.

28. Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, Ward KE, Mukhopadhyay A, Oaks J, Bielawski J, Szulc ZM, Thomas RJ, Selvam SP, Senkal CE, Garrett-Mayer E, De Palma RM, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumor suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med*. 2013; 5:105–21.
29. Rosa R, Marciano R, Malapelle U, Formisano L, Nappi L, D'Amato C, D'Amato V, Damiano V, Marfè G, Del Vecchio S, Zannetti A, Greco A, De Stefano A, et al. Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:138–47.
30. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res*. 2006; 66:7445–52.
31. Andolfo I, Liguori L, De Antonellis P, Cusanelli E, Marinaro F, Pistollato F, Garzia L, De Vita G, Petrosino G, Accordi B, Migliorati R, Basso G, Iolascon A, et al. The micro-RNA 199b-5p regulatory circuit involves Hes1, CD15, and epigenetic modifications in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2012; 14:596–612.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25:402–8.
33. Obuchowski NA. ROC analysis. *AJR Am J Roentgenol*. 2005; 184:364–72.
34. Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Papotti M, Dogliotti L, Bottini A, et al. Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27:227–34.
35. Caramés C, Cristóbal I, Moreno V, del Puerto L, Moreno I, Rodriguez M, Marin JP, Correa AV, Hernandez R, Zenzola V, Hernandez T, Leon A, Martin JI, et al. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2015; 30:899–906.
36. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clarck GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol*. 2005; 23:9067–72.

Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer

Supplementary Materials

Supplementary Table S1: Quantification of the expression levels of hsa-mir-199b by real-time PCR in 5 CRC cell lines

Cell line	SET OE	Mir-199b ($-\Delta\Delta C_T$)
SW480	yes	-4,89
WiDr	yes	No expression
DLD-1	yes	No expression
HT-29	yes	-4,30
SW620	yes	-0,25

OE: Overexpression.

$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{miR-199b}} - C_{T, \text{U6B}})_{\text{Cell Line}} - (C_{T, \text{Target Gene}} - C_{T, \text{U6B}})_{\text{Normal Controls}}$. The mean mir-199b expression from a set of 8 normal colonic mucosa samples was used as normal control in this experiment.

Supplementary Table S2: Clinical and molecular characteristics of a series of 97 patients with metastatic CRC

		No. (%)	
Sex			
Male	67	(69.1)	
Female	30	(30.9)	
Age			
< 70	44	(47.3)	
≥ 70	49	(52.7)	
No data	4		
ECOG			
0–2	75	(81.5)	
3–4	17	(18.5)	
No data	5		
MSI			
No	89	(93.7)	
Yes	6	(6.3)	
No data	2		
KRAS mutations			
No	58	(59.8)	
Yes	39	(40.2)	
Site of primary tumor			
Colon	72	(74.2)	
Rectum	25	(25.8)	
Synchronous metastasis			
No	39	(40.2)	
Yes	58	(59.8)	
Number of metastatic sites			
1–2	89	(91.8)	
> 2	8	(8.2)	
Liver metastasis			
No	33	(34)	
Yes	64	(66)	
Lung metastasis			
No	68	(70.1)	
Yes	29	(29.9)	
Lymph metastasis*			
No	68	(70.1)	
Yes	29	(29.9)	
Peritoneal metastasis			
No	78	(80.4)	
Yes	19	(19.6)	
Prior adjuvant chemotherapy**			
No	19	(48.7)	
Yes	20	(51.3)	
Treatment 1st line metastatic			
Oxaliplatin	39	(41.5)	
Irinotecan	13	(13.8)	
5-FU	9	(9.6)	
None	33	(35.1)	
No data	3		

*Non-regional lymph node involvement; **Cases with metachronous metastasis only.

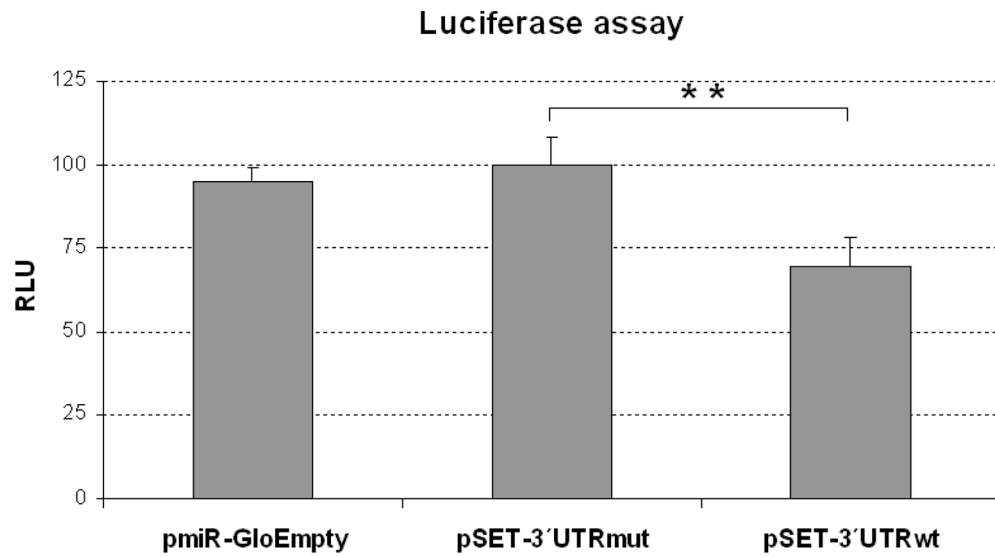
Supplementary Table S3: Predictive value of response to treatment by miR-199b deregulation in those patients who received oxaliplatin-based chemotherapy

	Response			
	Total	No progression (%)	Progression (%)	<i>p</i>
Low miR-199b	39	14	25	0.018
No	31	14 (100)	17 (68)	
Yes	8	0 (0)	8 (32)	

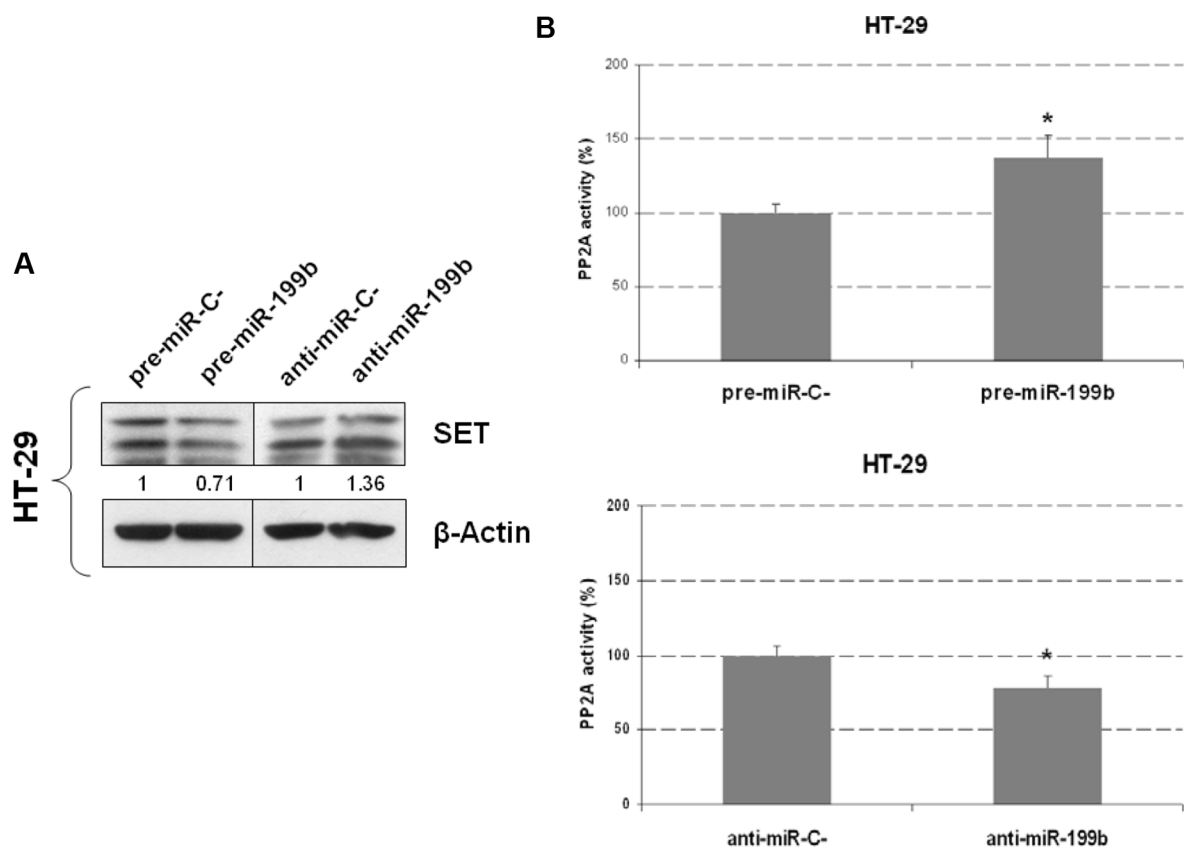
The Fisher exact test was applied to calculate the *p*-value.

Supplementary Table S4: Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 97 patients with metastatic CRC

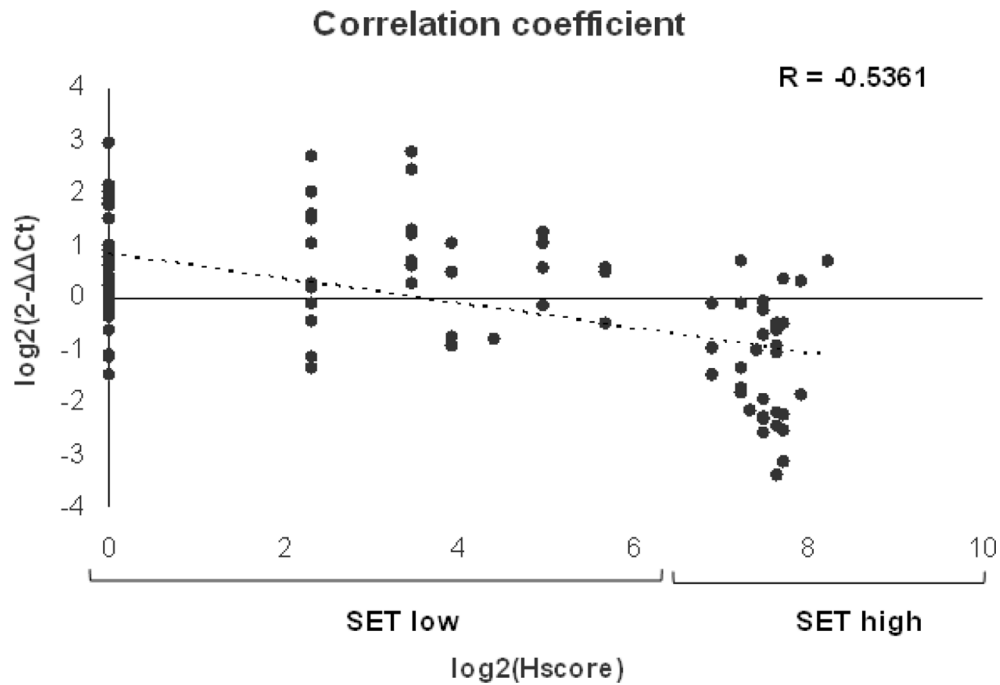
	Univariate PFS analysis				Multivariate PFS Cox analysis			
	95% CI				95% CI			
	HR	Lower	Upper	Significance	HR	Lower	Upper	Significance
Age				0.102				–
< 70	1.00							
≥ 70	1.79	0.89	3.62		–		–	
Gender				0.352				–
Male	1.00							
Female	0.71	0.34	1.45		–		–	
Synchronous				0.480				–
No	1.00							
Yes	1.32	0.61	2.86		–		–	
ECOG				0.008				0.040
0–2	1.00				1.00			
3–4	1.72	1.15	2.57		1.54	1.01	2.34	
Number of metastatic sites				0.225				–
1–2	1.00							
> 2	1.36	0.82	2.26		–		–	
MiR-199b downregulation				0.005				0.037
No	1.00				1.00			
Yes	2.94	1.38	6.27		2.32	1.05	5.13	



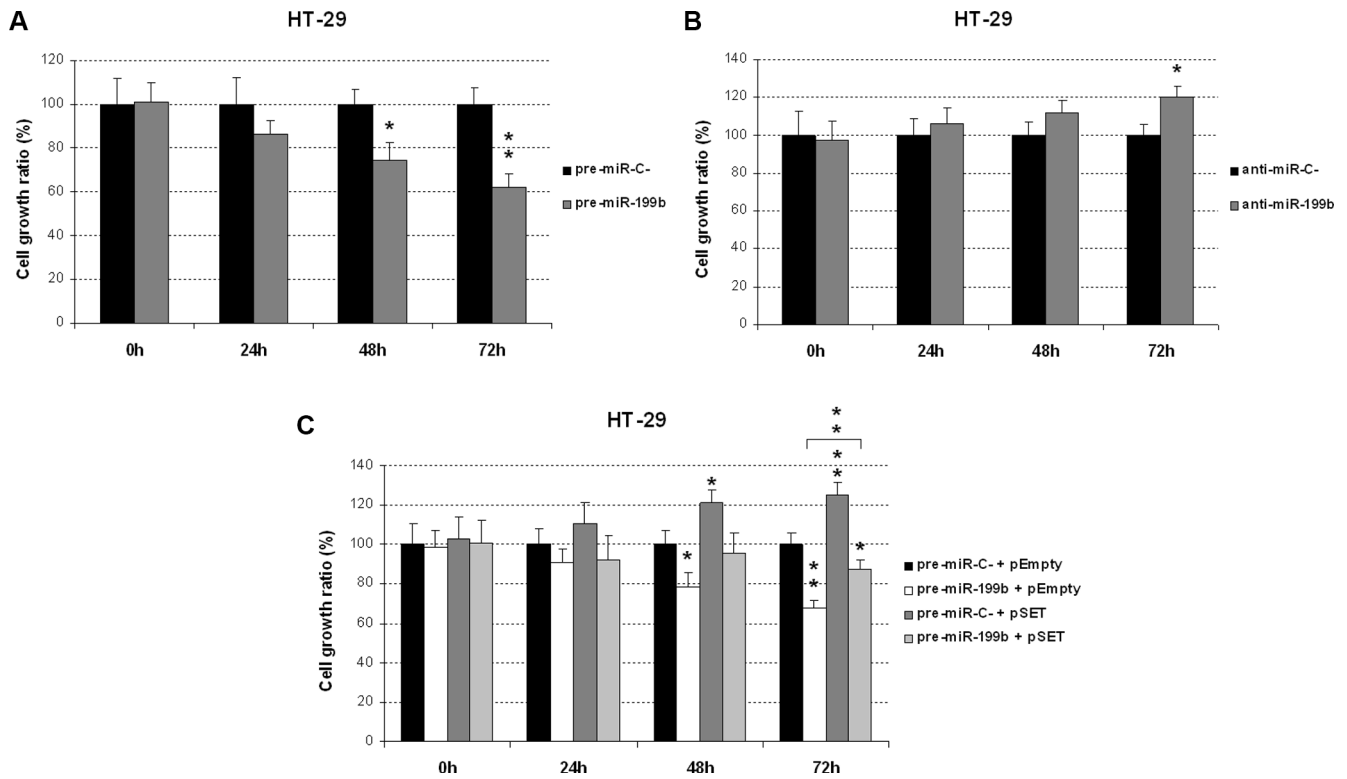
Supplementary Figure S1: Luciferase assay showing changes in Firefly luciferase activity in SW480 cells ectopically expressing miR-199b and transfected with pmiR-Glo empty (negative control), or a pmiR-Glo vector with the 3'UTR region of SET that includes the miR-199b seed region (pSET-3'UTRwt). Transfection with the 3'UTR region of SET including a mutated seed region for miR-199b (pSET-3'UTRmut) was used as reference control. Results were normalized to Renilla luciferase activity and represented as relative luminescence units (RLU). Data represented are mean of three independent experiments \pm SD. $P < 0.01$.**



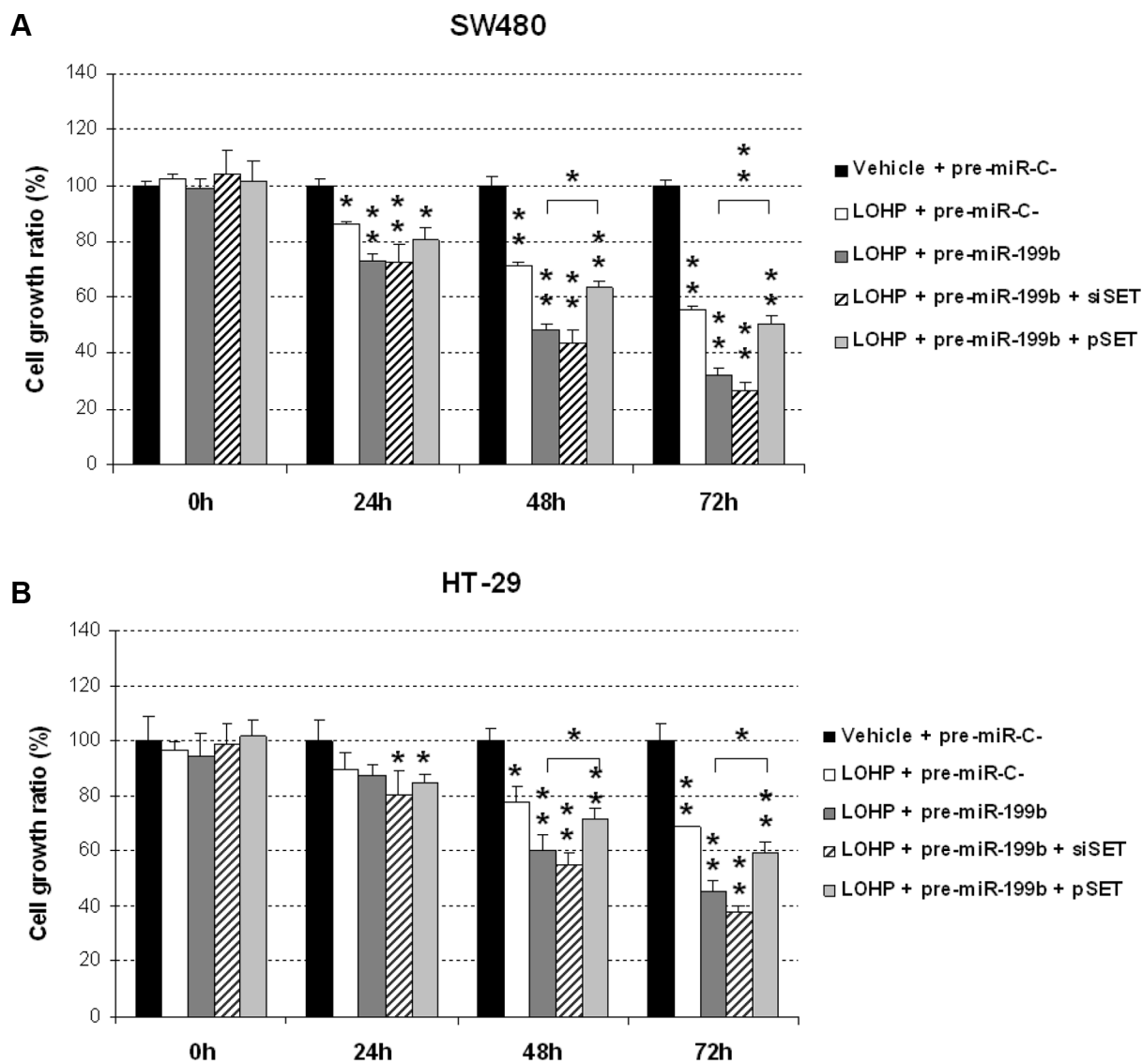
Supplementary Figure S2: (A) Western blot analysis showing SET expression in HT-29 cells transfected with pre- or anti-miR-199b; (B) PP2A assay showing changes in PP2A activity after transfection with pre- or anti-miR-199b.



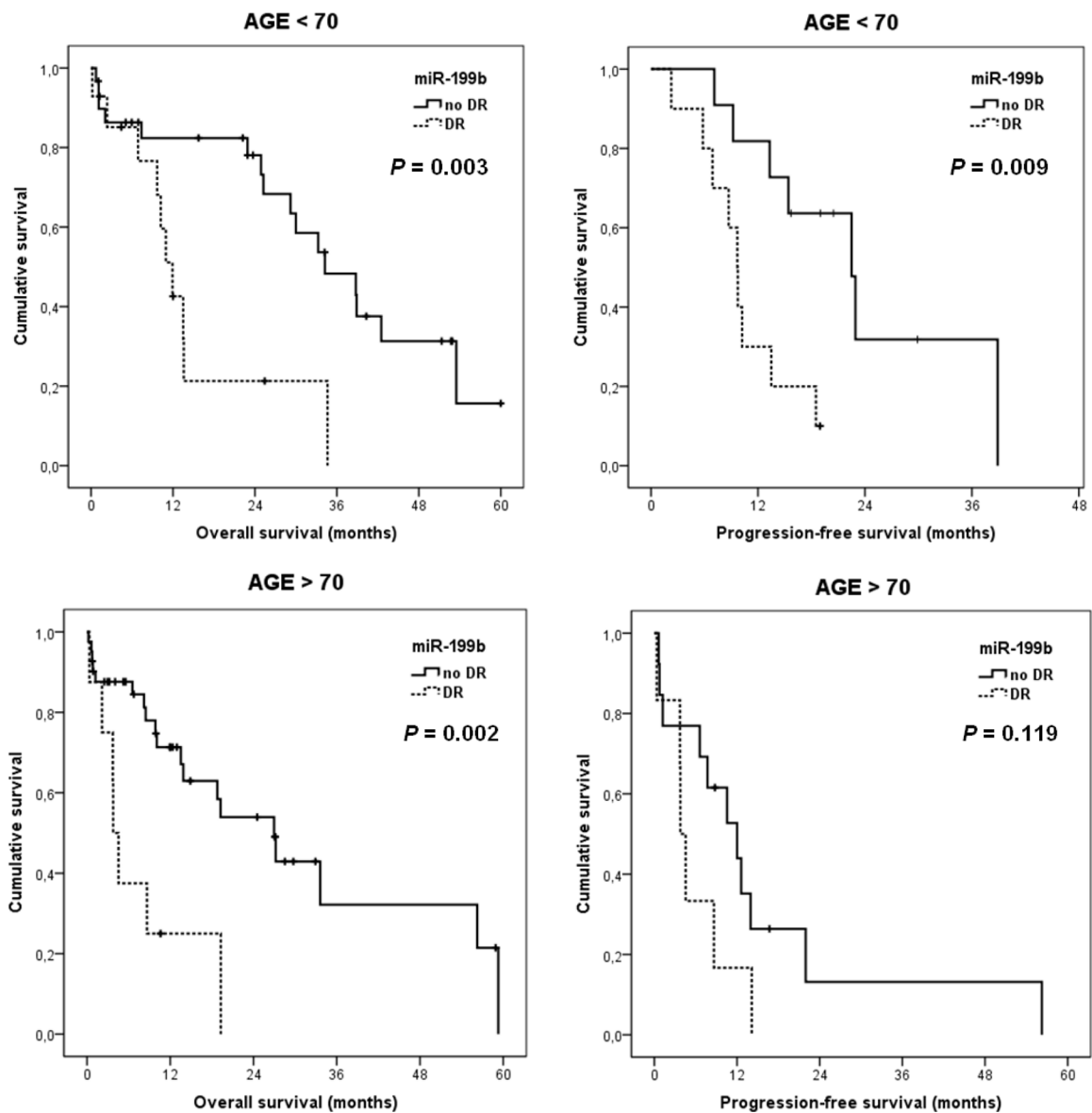
Supplementary Figure S3: Scatter plot showing the correlation between miR-199b and SET expression in 97 CRC patients.



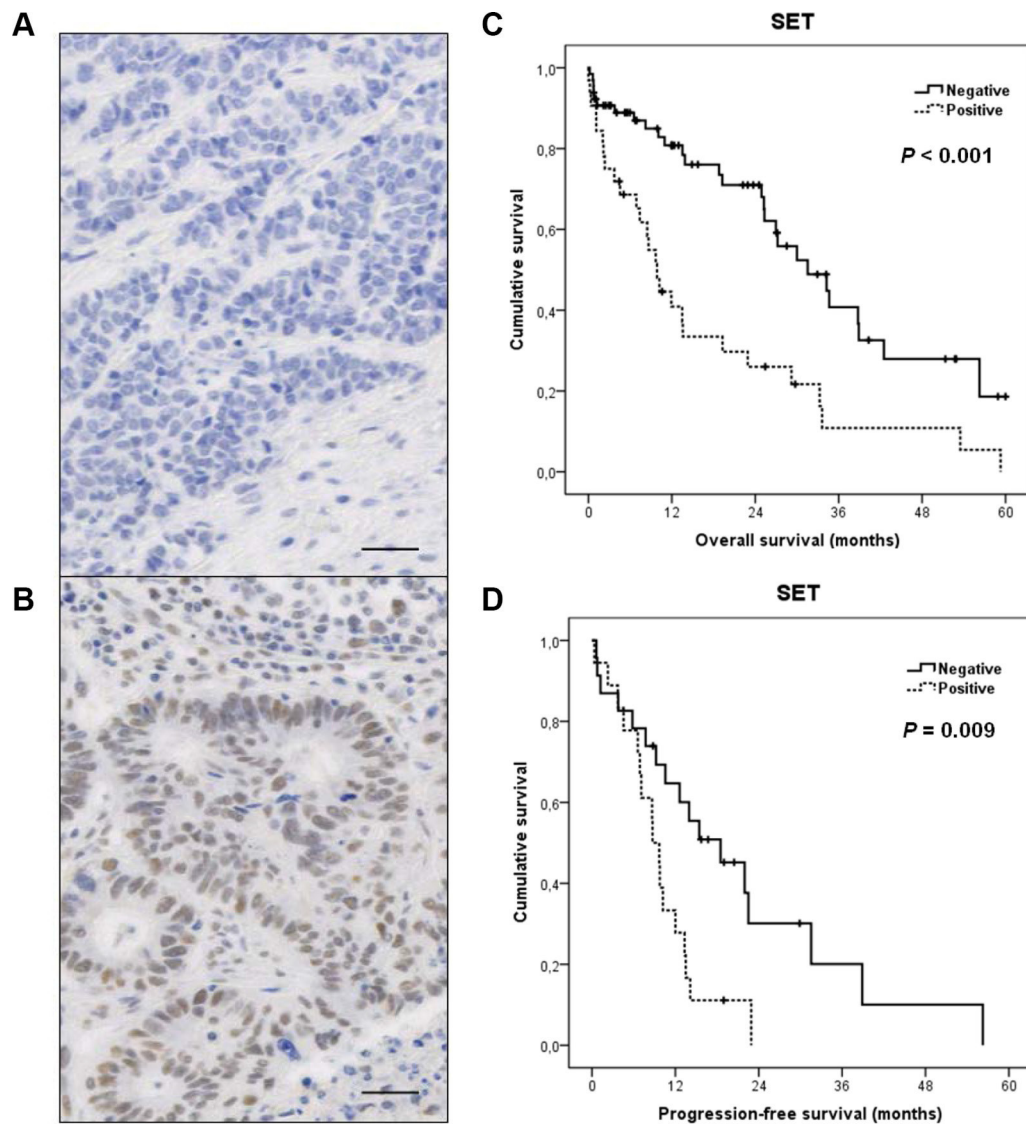
Supplementary Figure S4: MTS assay showing proliferation in HT-29 cells transfected with pre-miR-199b (A), anti-miR-199b (B) or both SET and pre-miR-199b (C); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



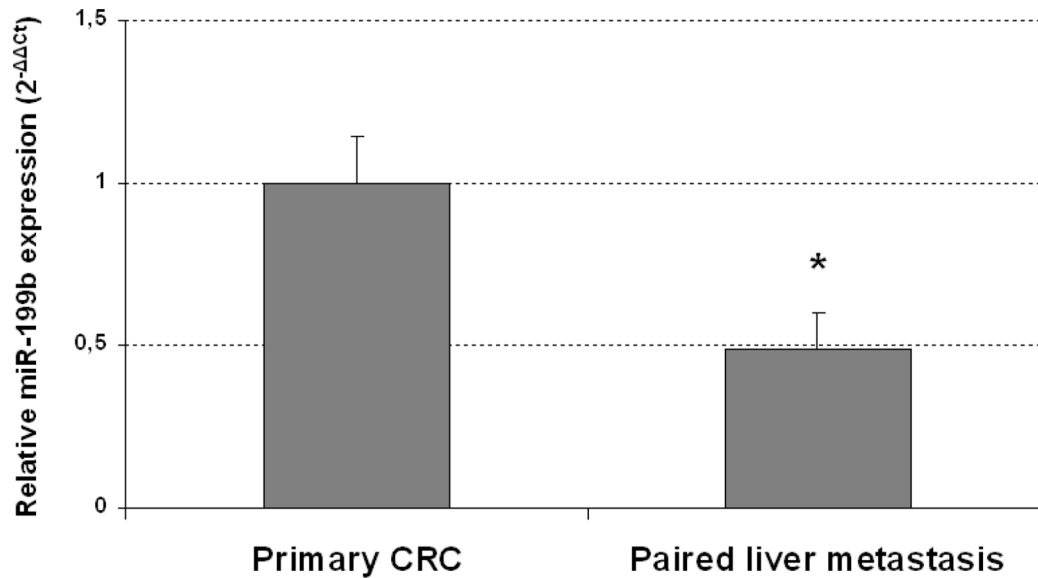
Supplementary Figure S5: MTS assay showing effects of SET modulation in miR-199b-dependent oxaliplatin re-sensitization in SW480 (A) and HT-29 cells (B); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$



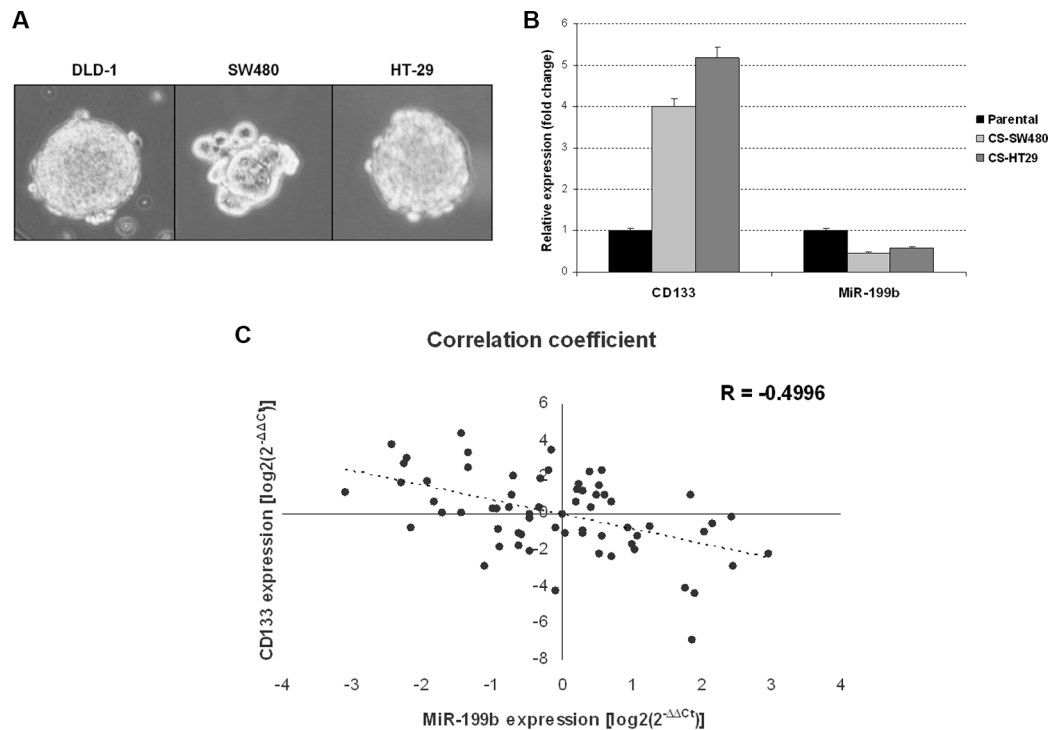
Supplementary Figure S6: Kaplan-Meier analyses of overall and progression-free survival and in the subgroups of patients younger ($N = 44$) and older than 70 years ($N = 49$).



Supplementary Figure S7: Immunohistochemical detection of SET expression in patients with metastatic colorectal cancer. SET negative (**A**) and positive (**B**) staining. The line in A and B shows 25 µm. Magnification x400. Kaplan-Meier analyses for SET in a cohort of 97 patients with metastatic CRC: (**C**) Overall survival; (**D**) Progression-free survival.



Supplementary Figure S8: Relative miR-199b expression in 10 CRC primary tumors compared with paired liver metastases. A related-samples Wilcoxon signed-ranked test was performed to assess statistical differences. * $P < 0.05$.



Supplementary Figure S9: (A) Optical microscope images showing DLD-1, SW480 and HT-29-derived colonospheres; **(B)** Quantification of miR-199b and CD133 expression in parental and colonosphere (CS)-derived SW480 and HT-29 cells. We used TaqMan Gene Expression Assays specific for *CD133* (Hs01009259_m1) and GAPDH as internal control; **(C)** Scatter plot showing the correlation between miR-199b and *CD133* expression in 64 metastatic CRC patients.

ARTÍCULO 2: Analysis of potential alterations affecting SETBP1 as a novel contributing mechanism to inhibit PP2A in colorectal cancer patients

La pérdida funcional del supresor tumoral PP2A se produce en una gran variedad de cánceres incluidos el CCR, y se ha descrito la sobreexpresión de SET como un mecanismo molecular clave en la inhibición de PP2A. A pesar de que la sobreexpresión de SETBP1 y las mutaciones con ganancia de función han sido descritas en varias neoplasias hematológicas como un evento común que incrementa los niveles del inhibidor de PP2A SET, y por tanto conduce la inactivación de PP2A, la existencia de alteraciones en SETBP1 no han sido estudiadas en CCR.

Por ello, hemos estudiado los perfiles de expresión de SETBP1 mediante Western blot en una serie de líneas celulares de CCR y muestras de pacientes. Además, hemos llevado a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación para analizar la formación del complejo SETBP1-SET-PP2A previamente descrito. Así mismo, hemos evaluado el estado mutacional de *SETBP1* mediante ensayos de pirosecuenciación en una cohorte de 55 pacientes de CCR con enfermedad metastásica en los cuales se ha llevado a cabo previamente una caracterización inmunohistoquímica de SET y p-PP2A para conocer la expresión de estas proteínas en la cohorte.

En este trabajo hemos encontrado una alta expresión de SETBP1 en varias de las líneas celulares estudiadas pero solo en dos de los pacientes analizados. Además, hemos demostrado que se forma el complejo heterotrimérico SETBP1-SET-PP2A en las células colorrectales. Sin embargo, no hemos detectado mutación alguna en *SETBP1* en ningún de las muestras de pacientes incluidas en este estudio.

Con todo esto, nuestros resultados sugieren que la expresión de SETBP1 es similar o inferior en tejidos tumorales en comparación con el tejido normal. Sin embargo, su sobreexpresión es una alteración poco prevalente que podría estar contribuyendo a la inhibición de PP2A en CCR a través de la formación del complejo SETBP1-SET-PP2A en algunos pacientes con esta enfermedad. Además, las mutaciones en *SETBP1* son, si existen, eventos muy poco frecuentes en pacientes con CCR.

Aportación del doctorando:

Me encargué de la redacción del artículo en su totalidad y de la posterior revisión del mismo tras las correcciones oportunas de mis directores de tesis. A nivel experimental, mi labor se centró en colaborar en la extracción de ácidos nucleicos de nuestra cohorte así

como el estudio completo de pirosecuenciación donde también está la parte de diseño de primers además de la ejecución de la técnica en el pirosecuenciador. Finalmente, me encargué también de la parte de western blot y ayudé en la realización de los experimentos de inmunoprecipitación.

Analysis of Potential Alterations Affecting SETBP1 as a Novel Contributing Mechanism to Inhibit PP2A in Colorectal Cancer Patients

Blanca Torrejón¹ · Ion Cristóbal¹ · Cristina Caramés¹ · Iván Prieto-Potín² · Cristina Chamizo¹ · Andrea Santos¹ · Marta Sanz-Alvarez² · Roberto Serna-Blasco¹ · Melania Luque² · Juan Madoz-Gúrpide² · Federico Rojo² · Jesús García-Foncillas¹

© Société Internationale de Chirurgie 2018

Abstract

Background The functional loss of the tumor suppressor protein phosphatase 2A (PP2A) occurs in a wide variety of human cancers including colorectal cancer (CRC), and SET overexpression has been reported as a key contributing mechanism to inhibit PP2A. Although SET binding protein 1 (SETBP1) overexpression and gain of function mutations have been described in several hematological malignancies as common events that increase the expression levels of the PP2A inhibitor SET, thereby leading to PP2A inactivation, the potential existence of SETBP1 alterations in CRC still remains unexplored.

Methods We studied the expression profile of SETBP1 by Western blot in a set of CRC cell lines and patient samples. Moreover, we performed co-immunoprecipitation assays to analyze the formation of the previously reported SETBP1–SET–PP2A inhibitory complex. Furthermore, we evaluated the mutational status of *SETBP1* by pyrosequencing assays in a cohort of 55 CRC patients with metastatic disease after the immunohistochemical characterization of SET and p-PP2A expression in this cohort.

Results We found high SETBP1 expression in several CRC lines but only in two of the patients analyzed. In addition, we demonstrated the formation of the SETBP1–SET–PP2A heterotrimeric complex in CRC cells. However, we failed to detect *SETBP1* mutations in any of the CRC patient samples included in the study.

Conclusions Our results suggest that SETBP1 expression is mainly similar or lower in colorectal cancer tissue compared to normal colonic mucosa. However, its overexpression is a low prevalent alteration which could contribute to inhibit PP2A in CRC through the formation of a SETBP1–SET–PP2A complex in some CRC patients. Moreover, *SETBP1* mutations are, if exist, rare events in CRC patients.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00268-018-4684-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ion Cristóbal
ion.cristobal@fjd.es

✉ Jesús García-Foncillas
jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu

² Pathology Department, Autonomous University of Madrid, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, 28040 Madrid, Spain

¹ Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Autonomous University of Madrid, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the gastrointestinal cancer with the highest incidence in Western countries. More than 2 million people are diagnosed every year with CRC, and more than 600,000 die due to this disease. The incidence of this cancer is higher in men than in women, and the mean age at diagnosis is 70 years [1]. CRC is characterized by an accumulation of genetic and epigenetic alterations that lead to tumor progression [2]. Despite the clinical advances achieved in the last decade, it is necessary to further understand the molecular mechanisms which drive progression in this disease in order to develop alternative therapeutic strategies to improve patient outcomes.

SET binding protein 1 (SETBP1) is a predominantly nuclear oncoprotein which has been reported to protect SET from proteasome degradation, thereby leading to protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition [3]. Many signaling pathways involved in cancer are regulated by the tumor suppressor PP2A, a major serine/threonine phosphatase [4, 5] whose loss of function is a common event in human cancer [6–9]. SET is an endogenous inhibitor of PP2A that plays an important role in regulation of many molecular processes, such as histone acetylation and cell migration [10, 11]. Several studies suggest that SET inhibits PP2A by directly binding to the catalytic domain of the phosphatase inhibiting the binding of the regulatory subunit, thereby impairing the formation of the heterotrimeric PP2A complex [12].

SETBP1 mutations in hematological diseases such as chronic and acute leukemias have been described [13–17]. Moreover, Piazza et al observed in their work that expression of SETBP1 mutants showed a similar effect inhibiting PP2A activity as SETBP1 overexpression [13]. The reported gain of function mutations affecting SETBP1 are mainly Glu858Lys, Asp868Asn/Tyr, Ser869Gly/Asn, Gly870Ser, Ile871Thr and Asp880Glu/Asn [13, 14]. Thus, cells with SETBP1 mutants expressed higher levels of SETBP1 and therefore they showed lower PP2A activity than wild-type cells [13]. It is well known that inactivation of PP2A is a common event in patients with CRC and this phosphatase has been reported to be a potential therapeutic target for this disease [18]. Of importance, SET overexpression has been identified as a key alteration to inactivate PP2A in CRC [19]. Although miR-199b-5p downregulation has recently been described as a contributing event to deregulate SET in CRC [20], the existence of a subgroup of SET-overexpressing CRC cases without this alteration highlights the presence of an additional SET-deregulating mechanism. Therefore, the molecular mechanisms that lead to SET deregulation in this disease remain to be fully clarified. Furthermore, several works highlight the prevalence of SETBP1 mutants in hematological malignancies,

but the potential existence and clinical relevance of SETBP1 mutations in CRC remain unexplored.

In this work, we investigated for the first time the status of SETBP1 in CRC. We aimed here to analyze the status of SETBP1 in CRC analyzing the potential formation of a functional SETBP1–SET–PP2A complex as well as evaluating the expression and existence of SETBP1 mutations as potential mechanisms to deregulate SET in this disease.

Materials and methods

Patient samples

This study included primary colorectal tissues which were surgical resection specimens from CRC tumors obtained from Fundación Jiménez Díaz Biobank (BFJD, Madrid, Spain). All patients agreed to participate in this study. A pathologist confirmed that tumor samples contained at least 80% tumor component. The project was approved by the Ethical Committee and Institutional Review Board of the institution.

Nucleic acid extraction and cDNA synthesis

The samples included in this work were deparaffined in xylene and washed with ethanol. The genomic DNA extraction was performed using $3 \times 10 \mu\text{m}$ sections of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue, using the QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The quantity and purity of extracted gDNA were determined using a NanoDrop (ND-2000 UV–Vis Spectrophotometer; Nanodrop Technologies).

PCR primers design and PCR amplification

PCR-specific primers were designed for SETBP1 amplification [GenBank: NG_027527, NM_015559 and NM_001130110] using the Entrez Global Query Cross-Database Search System and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) website [21], the Lasergene sequence analysis software (DNASar) and the ProbeFinder software (Roche). These specific primers were used considering: (1) the location of the forward (Fw) and reverse (Rv) primers in the region of interest; (2) the amplicon product that oscillated in length from 90 to 150 base pairs (bp); (3) the annealing temperature which ranges from 58 to 64 °C due to an optimal A/T:G/C ratio in the primer composition; (4) the primers that did not show formation of secondary structures.

PCR analyses were performed on a Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems) using 60 ng of cDNA as template, forward and reverse primers [0.2 μ M], deoxyribonucleotides (dNTPs) [0.2 mM], 5 U/ μ L of AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems), 1 \times AmpliTaq Gold buffer and MgCl₂ [1.5 mM] in a final reaction volume of 60 μ L. PCR conditions: 95° for 10 min, 45 cycles of 95° for 10 s and 60° during 30 s.

Pyrosequencing primers design and pyrosequencing assay

The products of PCR amplification were evaluated using the PyroMark Q24 instrument (Qiagen, Hilden, Germany). We assessed the mutational status of SETBP1 in codons 858, 868, 869, 870, 871 and 880 that belong to exon 4 [GenBank: NG_027527] in 55 tumor samples by pyrosequencing assays with the specific primers. The amplicon-specific pyrosequencing primers were designed according to the following conditions: the annealing distance to the mutation ranged from none to seven nucleotides; the primers showed absence of secondary structures formation; and the primer composition had an optimal A/T:G/C ratio in order to achieve an annealing temperature under 60°C (Fig. 1). Pyrosequencing primers were used at a final concentration of 0.3 μ M in annealing buffer. As positive control, we performed site-directed mutagenesis to generate an amplicon including the SETBP1 Glu858Lys mutation using genomic DNA from SW620, a CRC cell line previously described to be wild-type for SETBP1 [13]. The nucleotide dispensation order (NDO) for each assay was optimized to obtain the best result in the study of each mutation, according to the sequence to analyze, and they are described in Table 1. Then, we analyzed the pyrogram data to evaluate SETBP1 mutation status by using Pyromark software (Qiagen).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry analyses were performed as previously described [19, 22]. Briefly, tissue sections (3 μ m) were placed on plus-charged glass slides. After deparaffinization in xylene and graded alcohols, heat antigen retrieval was performed in pH9 EDTA-based buffer (Dako). Endogenous peroxidase was blocked by 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides were incubated with the same primary antibody against SET or p-PP2A as described for 60 min at room temperature, followed by appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (Flex+, Dako). Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. All stainings were performed in a Dako Autostainer. A semiquantitative histoscore was calculated by estimation of the percentage of

tumor cells positively stained with low, medium or high staining intensity. The final score was determined after applying a weighting factor to each estimate. The following formula was used: $\text{histoscore} = (\text{low } \%) \times 1 + (\text{medium } \%) \times 2 + (\text{high } \%) \times 3$, and the results ranged from 0 to 300.

Immunoprecipitation and Western blotting

Experiments were performed as previously described [3]. Briefly, cells were lysed in 100 μ L of lysis buffer containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors (Complete Mini; Roche Diagnostics). After incubation on ice (30 min), protein extracts were clarified (12,000g, 15 min, 4°C), denatured and subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-SETBP1 (Sigma Aldrich), goat polyclonal anti-SET (Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-PP2A (clone 1D6, Upstate). For immunoprecipitation, lysates were precleared (1 h, 4°C) on a rotating wheel and immunoprecipitated with antibody-bound protein G-Sepharose (8 h, 4°C). After washings, immunoprecipitations were subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot.

Results

SETBP1 expression profile in CRC cell lines and patient samples

We first investigated the potential functional relevance of SETBP1 in CRC, analyzing by Western blot its expression levels in a panel of 10 CRC cell lines. We observed that five cell lines (COLO-320, CCD-18Co, HCT-116, LS174T and SW620) showed a markedly higher SETBP1 expression than the other five CRC cell lines included in the analysis (Fig. 2a). Of importance, this observation would highlight that SETBP1 overexpression could represent a novel relevant contributing alteration to inhibit PP2A in some CRC cell lines. However, when we next performed a similar analysis in a set of 14 CRC patients with paired normal colonic mucosa and tumor sample available, we unexpectedly observed that the majority of the cases studied showed similar or even higher SETBP1 levels in the normal mucosa than in the tumor tissue, and only two cases (P2 y P13) showed a tumoral SETBP1 overexpression (Fig. 2b). We also analyzed the expression levels of SET in this set of 14 CRC patients, observing that those two cases with SETBP1 overexpression also showed markedly higher SET expression levels in the tumor tissue in comparison with their paired normal mucosa

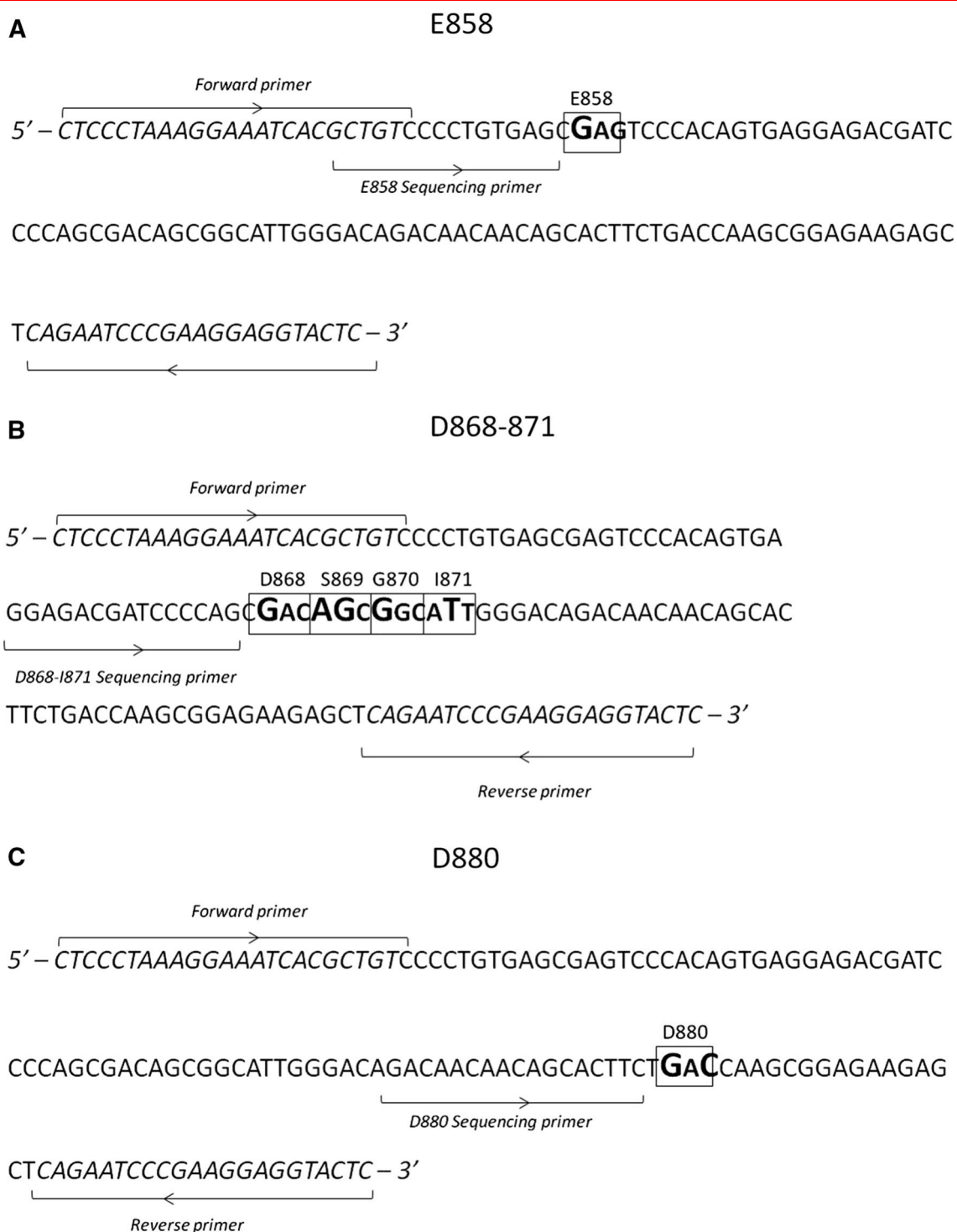


Fig. 1 Pyrosequencing assay maps and primer designs for SETBP1 assays **a** E858, **b** D868-871 and **c** D880

(Supplementary Fig. 1). These results prompted us to confirm our observations using GEPIA, a recently created bioinformatics tool for analyzing gene expression data from the TCGA and the GTEx projects [23]. In

concordance with our results, we observed significant lower SETBP1 expression levels in tumor tissue than in normal mucosa in both colon and rectal adenocarcinoma (Supplementary Fig. 2).

Table 1 Nucleotide dispensation orders (NDO) for SETBP1 assays

Target	Assay	NDO
SETBP1	E858K	TCGAGTGCAC
	D868-I871	GCGTATCAGACAGCGACTGA
	D880E/N	CTGAGCGAGCG

Formation of the SETBP1–SET–PP2A inhibitory complex in CRC cells

To confirm the PP2A inactivating function previously reported for SETBP1 in CRC cells, we performed co-immunoprecipitation assays using protein lysates from the SW620 cell line in order to detect the formation of the heterotrimeric SETBP1–SET–PP2A inhibitory complex (Fig. 3).

Interestingly, our results demonstrate that SETBP1 is functioning in CRC and the SETBP1–SET–PP2A complex is formed. Moreover, these findings were further confirmed in the CCD-18-Co CRC cell line (Fig. 3).

Evaluation of the SETBP1 mutational status in CRC patient samples

In order to explore the potential existence of SETBP1 deregulation mechanisms alternative to its overexpression, we next analyzed the SETBP1 mutational status in a cohort of 55 patients with metastatic CRC. Patient clinicopathological characteristics of our series are summarized in Table 2. We first explored the PP2A activation status in our cohort analyzing both SET and PP2A phosphorylation (Y307), which have previously been reported to be key PP2A inhibitory alterations in CRC closely related to SETBP1. Immunohistochemistry (IHC) assays were carried out in 35 out of 55 patients (those with enough material available). Of note, we observed that seven and six of those 35 cases showed high levels of SET and p-PP2A, respectively. Moreover, two patients simultaneously presented these two alterations, and PP2A was found inhibited in other 11 cases with only high SET or p-PP2A levels.

To study the SETBP1 mutation status, we first amplified the genomic region containing codons 858–880, which has been reported to include most of the reported SETBP1

Fig. 2 Western blot analysis showing the expression profile of SETBP1 in both CRC cell lines (a) and patient samples (b)

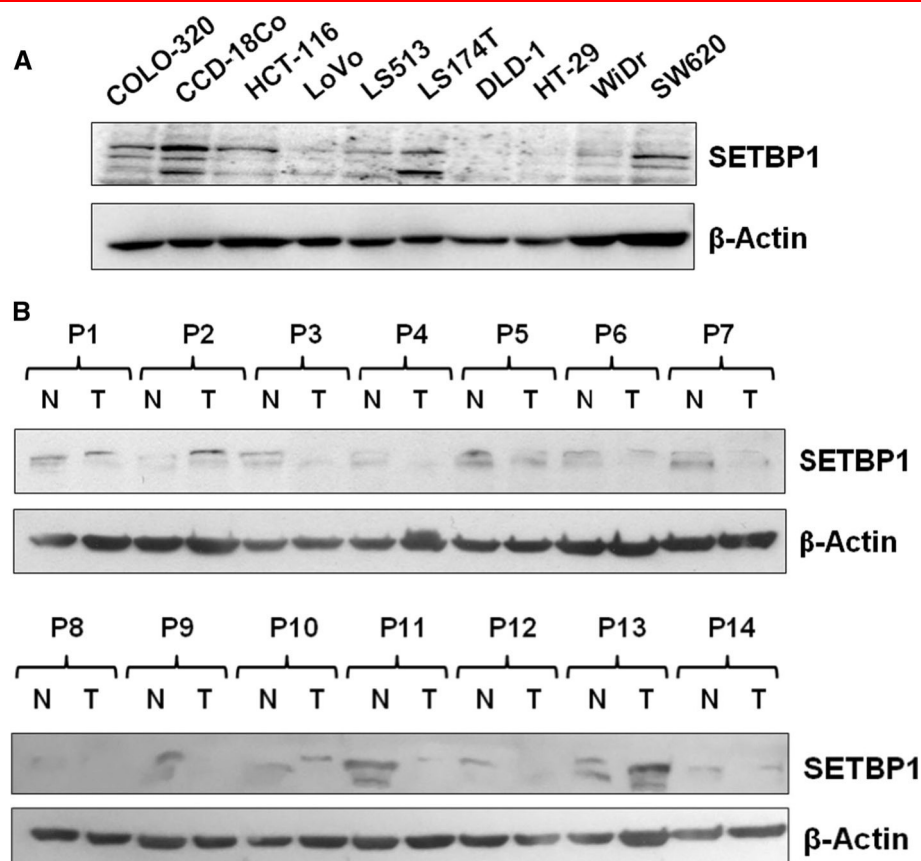
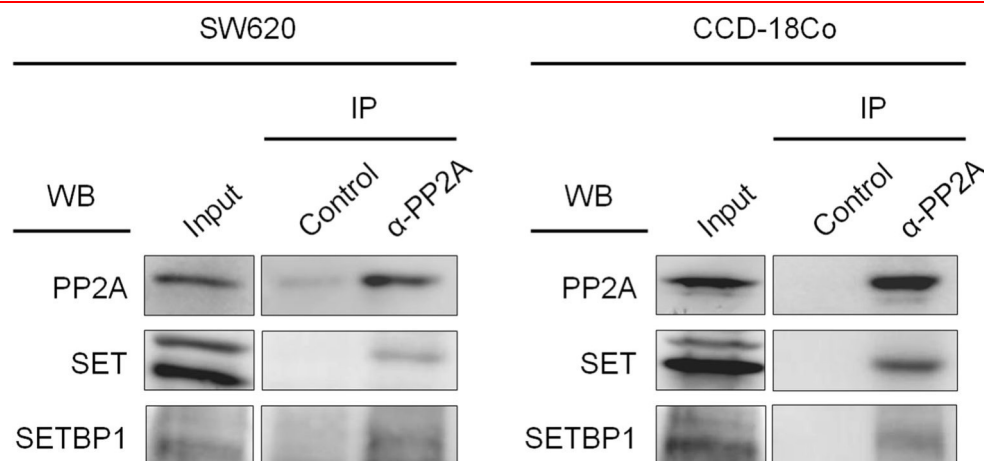


Fig. 3 Immunoprecipitation showing the formation of a SEBP1–SET–PP2A complex in CRC cells. Protein extracts were incubated with Sepharose-protein G beads without primary antibody as negative control



mutations in the literature [13, 14]. All samples were successfully amplified by PCR. Amplification products were then visualized by electrophoresis in a 2% agarose gel to validate the expected size and to confirm the absence of primer–dimer formation as well as potential PCR contaminations. We next determined the mutational status of SETBP1 performing specific pyrosequencing assays. However, we failed to detect SETBP1 mutations in any of the CRC patient samples included in the study. Altogether, our results would indicate that SETBP1 mutations are, if exist, very low recurrent events in CRC patients.

Discussion

SETBP1 has been reported to be overexpressed in acute myeloid leukemia (AML), protecting SET protein from proteasome degradation, thereby increasing the amount of full-length SET protein and finally resulting in PP2A inactivation through the formation of a SETBP1–SET–PP2A complex. In CRC, PP2A has emerged in recent years as a tumor suppressor frequently inactivated through different molecular strategies including the overexpression of SET [19]. Moreover, miR-199b downregulation was identified as an alteration responsible of SET upregulation in around half of those CRC patients with high SET levels [20]. However, the identification of SET-overexpressing CRC cases without miR-199b deregulation highlights the existence of alternative SET-deregulating alterations in this disease. Thus, we aimed here to explore for the first time the status of SETBP1 in this disease as a potential novel SET-deregulating mechanism. In concordance with previous observations in AML [3], we observed high SETBP1 expression in 5 out of the 10 CRC cell lines analyzed. However, only 2 out of 14 CRC cases showed SETBP1 overexpression in tumor tissue compared to the paired normal colonic mucosa, which indicates that in CRC

patients this seems not to be a very prevalent alteration. Importantly, these observations about the lack of correlation between the results observed in cell lines and patient samples provide an important warning against the use of established CRC cell lines for the selection of novel treatments targeting phosphorylation or dephosphorylation mechanisms in CRC.

This issue prompted us to explore SETBP1-deregulating strategies alternative to its overexpression such as its previously reported gain of function mutations. Thus, we investigated the mutational status of SETBP1 in 55 CRC patients, a cohort in which we first evaluated both SET and p-PP2A levels. Of importance, these two alterations are closely related to SETBP1 since this protein stabilizes and increases SET, and SETBP1 mutations have been described to enhance p-PP2A on Y307 [19]. Interestingly, Piazza et al determined in their work that SETBP1 mutations led to increased SETBP1 expression levels. Interestingly, amino acids 860–880 include a region critical for ubiquitin binding and subsequent protein degradation. The authors demonstrated that the Gly870Ser alteration impaired the binding of the E3 ubiquitin ligase, leading to differences in SETBP1 protein stability. In fact, cells expressing SETBP1 Gly870Ser showed higher levels of SETBP1 protein together as well as greater p-PP2A on Y307 and PP2A inhibited activity. They analyzed the frequency of SETBP1 mutations in 644 leukemia patient samples, observing that around 25% of cases had SETBP1 mutations. They also demonstrated that 92% of SETBP1 mutations detected in liquid tumors were located in a short region of 14 residues from Glu858 to Ile871.

However, no mutations were detected when they analyzed a panel of CRC cell lines [13]. This observation is in concordance with our findings and further supports that SETBP1 mutations are probably not frequent in CRC. Furthermore, Makishima and colleagues identified SETBP1 mutations in the same region, describing

Table 2 Clinical and molecular characteristics of a cohort of 55 patients with mCRC

	No. (%)
Sex	
Male	32 (58.2)
Female	23 (41.8)
Age	
<60	9 (16.4)
>60	46 (83.6)
KRAS mutations	
No	13 (25)
Yes	39 (75)
No data	3
Site of primary tumor	
Colon	40 (72.7)
Rectum	15 (27.3)
Synchronous metastasis	
No	17 (30.9)
Yes	38 (69.1)
T	
T1	0
T2	4 (7.5)
T3	33 (62.3)
T4	11 (20.8)
TX	5 (9.4)
No data	2
N	
N0	12 (22.7)
N1	20 (37.7)
N2	13 (24.5)
N3	8 (15.1)
No data	2
SET overexpression	
No	28 (80)
Yes	7 (20)
No data	20
PP2A hyperphosphorylation	
No	29 (82.9)
Yes	6 (17.1)
No data	20
MSI	
No	31 (91.2)
Yes	3 (8.8)
No data	21
BRAF mutations	
No	49 (90.7)
Yes	5 (9.3)
No data	1
ECOG	
0–2	41 (77.3)
3–4	12 (22.7)

Table 2 continued

	No. (%)
No data	2
Number of metastatic sites	
1–2	50 (96.2)
>2	2 (3.8)
No data	3

Asp868Asn, Gly870Ser and Ile871Thr as the most frequent mutations. [14]. We analyzed SETBP1 mutational status in SETBP1 codons 858–880 in our CRC patient cohort. Our findings indicate that this alteration, if exists, would be of low prevalence in CRC. However, the small number of samples analyzed does not allow excluding the existence of SETBP1 mutations in a subgroup of CRC patients and represents a limitation of our study. Therefore, further validation in a larger independent cohort is warranted. Moreover, it would be very interesting to confirm our results in a series of CRC patients with SET overexpression since one would expect a higher prevalence of SETBP1 mutations in this subgroup of CRC patients. Additionally, we could also analyze potential copy number changes in the genomic region 18q12 in our cohort in order to identify genomic alterations affecting the SETBP1 gene. In fact, the precise alterations driving SETBP1 deregulation have not evaluated except in a case showing a chromosome rearrangement.

In conclusion, our findings indicate that SETBP1 is functionally active in CRC through the formation of the SETBP1–SET–PP2A complex. Moreover, SETBP1 overexpression emerges as a novel potential mechanism to contribute to SET deregulation and PP2A inhibition in some CRC cases. However, mutations affecting SETBP1 are not a relevant event in metastatic CRC and do not contribute to SET deregulation in those patients. Thus, the precise biological relevance of SETBP1 in CRC together with its potential clinical implications should be investigated in forthcoming studies.

Acknowledgments This work was supported by PI15/00934 and PI16/01468 grants from “Instituto de Salud Carlos III FEDER”, Spain. B.T. is supported by “Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz”.

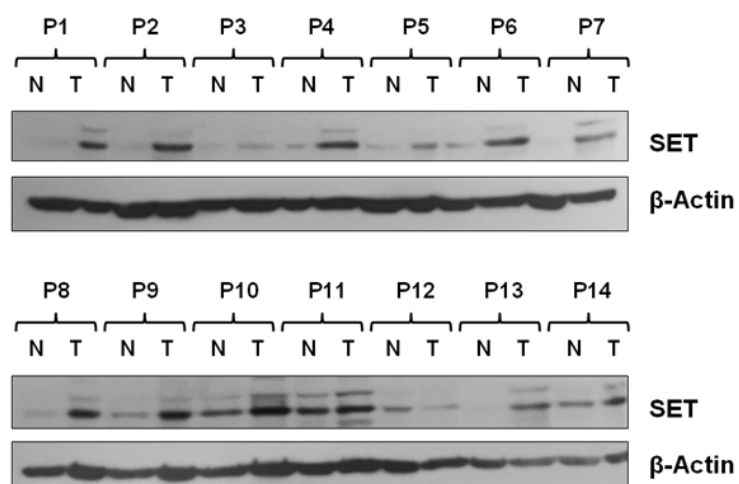
Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

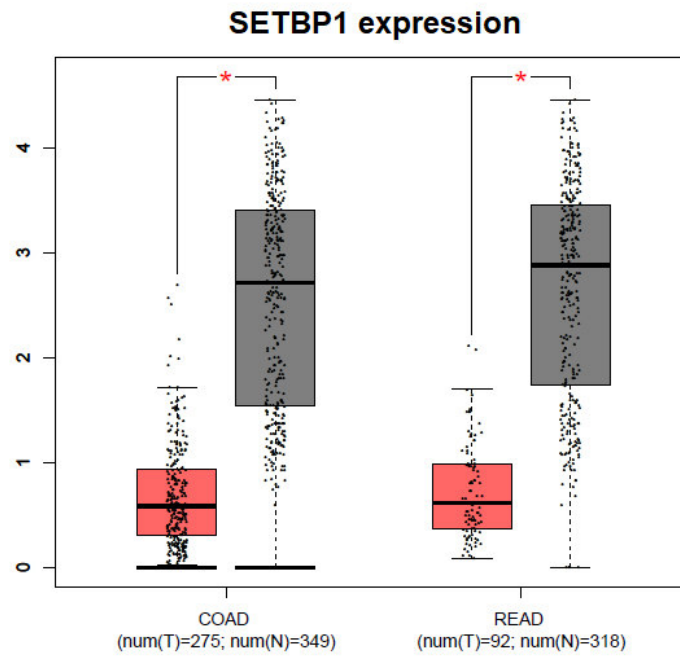
References

- Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014) Colorectal cancer. Lancet 383:1490–1502

2. Linnekamp JF, Wang X, Medema JP et al (2015) Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes. *Cancer Res* 75:245–249
3. Cristóbal I, Blanco FJ, García-Orti L et al (2010) SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 115:615–625
4. Ruvolo PP (2016) The broken “Off” switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance. *BBA Clin* 6:87–99
5. Rincón R, Cristóbal I, Zazo S et al (2015) PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget* 6:4299–4314
6. Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353:417–439
7. Zolnierowicz S (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signalling pathways. *Biochem Pharmacol* 60:1225–1235
8. Xie F, Bao X, Yu J et al (2015) Disruption and inactivation of the PP2A complex promotes the proliferation and angiogenesis of hemangioma endothelial cells through activating AKT and ERK. *Oncotarget* 6:25660–25676
9. Grech G, Baldacchino S, Saliba C et al (2016) Deregulation of the protein phosphatase 2A, PP2A in cancer: complexity and therapeutics options. *Tumour Biol* 37:11691–11700
10. Seo SB, McNamara P, Heo S et al (2001) Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the SET oncoprotein. *Cell* 104:119–130
11. ten Klooster JP, Iv Leeuwen, Scheres N et al (2009) Rac-1 induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J* 26:336–345
12. Eichhorn PJ, Creghton MP, Bernards R (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1795:1–15
13. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N et al (2013) Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 45:18–24
14. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N et al (2013) Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet* 45:942–946
15. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL et al (2014) ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia* 28:2206–2212
16. Kanagal-Shamanna R, Luthra R, Yin CC et al (2016) Myeloid neoplasms with isolated isochromosome 17q demonstrate a high frequency of mutations in SETBP1, SRSF2, ASXL1 and NRAS. *Oncotarget* 7:14251–14258
17. Bresolin S, De Filippi P, Vendemini F et al (2016) Mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the Italian AIEOP study group. *Oncotarget* 7:28914–28919
18. Cristóbal I, Manso R, Rincón R et al (2014) PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol Cancer Ther* 13:938–947
19. Cristóbal I, Rincón R, Manso R et al (2015) Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 21:347–356
20. Cristóbal I, Caramés C, Rincón R et al (2016) Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 8:40169–40180
21. Nacional Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 17 Nov 2016
22. Cristóbal I, Manso R, Rincón R et al (2014) Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 111:756–762
23. Tang Z, Li C, Kang B et al (2017) GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 45(W1):W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1. Western blot analysis showing the expression profile of SET in 14 CRC patients.



Supplementary Figure 2. Bioinformatic analysis of SETBP1 expression in tumor tissue and normal mucosa of colon and rectal adenocarcinoma; COAD: colon adenocarcinoma; READ: rectal adenocarcinoma. * $P < 0.05$.

ARTÍCULO 3: Caveolin-1 is markedly downregulated in patients with earle-stage colorectal cancer

CAV-1, la principal proteína estructural de las caveolas, está frecuentemente desregulada en cáncer. Cabe destacar que esta proteína ha sido descrita como un supresor tumoral o tener propiedades oncogénicas en función del tipo celular y del estadio de la enfermedad. De hecho, su papel en CCR no se conoce con certeza y debería estudiarse en detalle debido a las discrepancias encontradas en la literatura.

En este trabajo hemos analizado por Western blot los niveles de expresión de CAV-1 en una cohorte de pacientes con CCR localizado en los que había disponible tejido tumoral y mucosa colónica normal pareada. Se cuantificaron, mediante PCR a tiempo real, los niveles de expresión de ARN mensajero de CAV-1 y de los miRs 124, 133 y 802, que han sido previamente descritos como reguladores de esta proteína.

Hemos encontrado una baja regulación de CAV-1 en el 76,2% de las muestras tumorales, asociada significativamente con el subgrupo de pacientes mayores de 70 años ($p=0.027$). Además, hemos observado una falta de correlación entre los niveles proteicos de CAV-1 y los de ARN mensajero en algunos de los casos que presentaban una baja expresión de la proteína y, posteriormente, se identificó la desregulación del miR-124 como una potencial alteración que contribuye a la desregulación de los niveles de expresión proteicos de CAV-1.

Con todo esto podemos concluir que CAV-1 está comúnmente desregulada en pacientes con CCR localizado, lo cual sugiere que actúa como supresor tumoral en estadios tempranos de la enfermedad. Además, basándonos en nuestros hallazgos, las discrepancias previamente observadas en diferentes estudios pueden ser debidas a una compleja regulación de CAV-1 a nivel post-traducciona.

Aportación del doctorando:

Mi aportación en este manuscrito fue llevar a cabo la selección de pacientes con cáncer colorrectal localizado al diagnóstico y muestra congelada pareada tumoral y mucosa colónica normal adyacente así como la búsqueda de las mismas en los archivos del biobanco de nuestra institución. Además, me encargué de la extracción de RNA y proteína de los mismos para después hacer los experimentos de análisis de microRNAs por PCR a tiempo real y de análisis de CAV-1 por western blot. Finalmente, contribuí a la redacción del artículo mediante la escritura de una primera versión del mismo.

Caveolin-1 is Markedly Downregulated in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer

Blanca Torrejón¹ · Ion Cristóbal¹ · Federico Rojo² · Jesús García-Foncillas¹

© Société Internationale de Chirurgie 2017

Abstract

Background Caveolin-1 (CAV-1), the main scaffold protein in caveolae, is frequently deregulated in human cancer. Of importance, this protein has been described to show tumor suppressor or oncogenic properties depending on the cell type and the stage of the disease. In fact, its role in colorectal cancer (CRC) remains to be fully clarified due to discrepancies in the literature.

Methods We analyzed CAV-1 by western blot in a set of early-stage CRC patients with paired tumor tissue and normal colonic mucosa available. CAV-1 mRNA and expression levels of miR-124, 133 and 802 were quantified by real-time PCR.

Results We found CAV-1 strongly downregulated in 76.2% of tumor samples and associated with the subgroup of elderly patients ($p = 0.027$). We observed by real-time PCR a lack of correlation between CAV-1 mRNA and protein levels in some cases with CAV-1 downregulated by western blot, and miR-124 deregulation was identified as a potential contributing alteration to decrease CAV-1 protein expression.

Conclusion CAV-1 is commonly downregulated in patients with primary CRC, which suggests its tumor suppressor role in early stages of this disease. Moreover, based on our findings, the previous discrepancies observed in different studies to date could be due to a complex posttranscriptional CAV-1 regulation.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00268-017-4065-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ion Cristóbal
ion.cristobal@fjd.es

✉ Jesús García-Foncillas
jgfoncillas@fjd.es

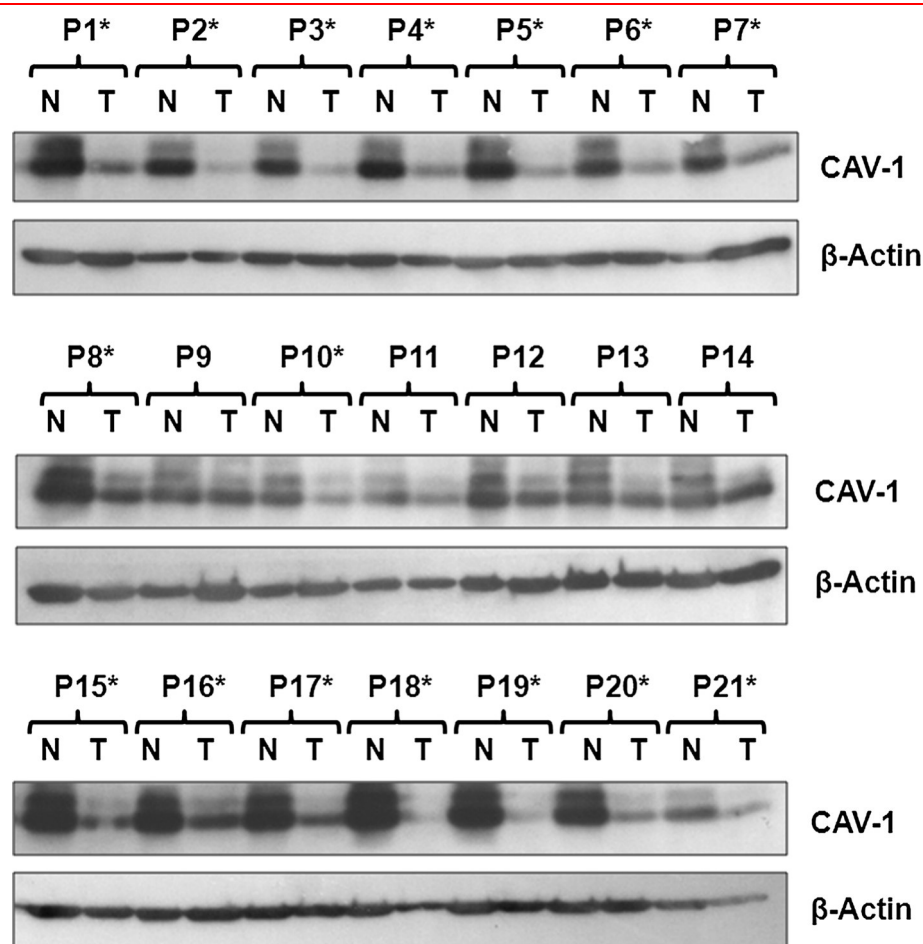
¹ Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

² Pathology Department, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, Autonomous University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

Introduction

Caveolin-1 (CAV-1) represents the main scaffold protein of caveolae with high relevance in cellular internalization processes [1]. CAV-1 has been described implicated in endocytosis, membrane traffic and signal transduction [2, 3]. Moreover, several studies suggest that this protein could play a role in malignant transformation and tumorigenesis [4, 5]. In fact, it has been demonstrated that CAV-1 could act as a tumor suppressor or as a tumorigenesis promoter depending on the type of tissue and the stage of the disease [6]. CAV-1 has been found upregulated in ovarian, lung and breast cancers but downregulated in bladder, esophagus, thyroid and prostate carcinomas [7, 8]. Although several

Fig. 1 Analysis of CAV-1 expression by western blot in CRC patients with paired normal mucosa and primary tumor samples. *N* normal colonic mucosa, *T* tumor sample; *asterisk* CAV-1 downregulation



works have studied the role of CAV-1 in different stages of CRC, it still has to be fully clarified due to the existence of discrepancies in the observations reported to date. Thus, CAV-1 has been described to be higher expressed in CRC tumors than in adjacent normal mucosa [9–11]. On the contrary, observations from several other works have suggested CAV-1 would be playing a dual function, as tumor suppressor in early stages of CRC and as oncogene in advanced disease [12, 13]. In fact, this hypothesis is supported by the reported role of CAV-1 promoting cell invasion and metastasis of CRC cells [14, 15]. Moreover, it has been recently reported that CAV-1 determines unfavorable outcome in stage I–II CRC and was found associated with tumor with greater depths of invasiveness [16]. Thus, the precise status of CAV-1 in CRC must be fully clarified due to discrepancies in the existing literature.

In this work, we aimed to explore the status of CAV-1 in early stage of CRC. Western blot analyses confirmed CAV-1 expression downregulated in primary tumor samples regarding normal mucosa. Moreover, we observed by real-time PCR a lack of correlation between CAV-1 mRNA and protein levels in some patients from our cohort. This

observation prompted us to study the expression of several miRNAs previously reported to target CAV-1, thereby identifying that miR-124 deregulation could be contributing to impair CAV-1 translation in some of those cases.

Materials and methods

Patient samples

This study included fresh-frozen samples from 21 patients with CRC kindly provided by the Fundación Jiménez Díaz Biobank (Madrid, Spain). Paired normal mucosa was obtained from each case included in the study and used as control. A pathologist confirmed that all tumor samples had more than 70% tumoral components. Informed consent was obtained in all cases. The ethical committee and institutional review board approved the project.

Western blot analysis

Protein extracts were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following manufacturer's indications, clarified

Table 1 Association between CAV1 and clinical and molecular parameters in the set of 21 CRC patients included in the study

	No. Cases	No. CAV1 DR+ (%)	No. CAV1 DR– (%)	<i>p</i>
CAV1	21	16 (76.2)	5 (23.8)	
Sex	21	16	5	0.517
Male	15	12 (80)	3 (20)	
Female	6	4 (66.7)	2 (33.3)	
Age	21	16	5	0.027
<70	8	4 (50)	4 (50)	
≥70	13	12 (92.3)	1 (7.7)	
T	21	16	5	0.294
1	1	1 (100)	0 (0)	
2	8	6 (75)	2 (25)	
3	11	9 (81.9)	2 (18.1)	
4	1	0 (0)	1 (100)	
N	21	16	5	0.675
0	16	12 (75)	4 (25)	
1	2	2 (100)	0 (0)	
2	3	2 (66.7)	1 (33.3)	
Stage	21	16	5	0.974
I	8	6 (75)	2 (25)	
II	8	6 (75)	2 (25)	
III	5	4 (80)	1 (20)	
Site of primary tumor	21	16	5	0.469
Colon	14	10 (71.4)	4 (28.6)	
Rectum	7	6 (85.7)	1 (14.3)	

Statistically significant results are in bold

(12,000 rcf, 15 min, 4 °C), denatured and subjected to SDS-PAGE and western blot analysis. Antibodies used are: rabbit polyclonal anti-Caveolin-1 (SC-894; Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-β-actin (A1978-200UL; Sigma). Proteins were detected with the appropriate secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) by chemiluminescence using Tropix CSPD and Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems).

Quantification of CAV1 by real-time PCR

cDNA was synthesized with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantification of the expression of *CAV1* was performed using a specific TaqMan Gene Expression Assay for CAV-1 (Applied Biosystems; Hs00971716) and *GAPDH* as internal control. Analysis of relative gene expression data was performed using the $2^{-T^{\Delta C}}$ method [17].

Quantification of miRNA expression levels

Samples were reverse-transcribed using the TaqManHMi-croRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). miRNAs were quantified by quantitative real-time RT-PCR

using TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) specific for miR-133a (miR-133a_002246), miR-124 (miR-124_002197), miR-802 (miR-802_002004) and U6B as internal control. Analysis of relative gene expression data was performed using the $2^{-T^{\Delta C}}$. The mean expression value of the global cohort ($\Delta C_{T, \text{cohort}}$) was used to obtain the relative expression of each sample ($\Delta \Delta C_t$), and the fold change was calculated as $2^{-\Delta \Delta C_t}$.

Results

Primary CRC tissues show strongly reduced CAV-1 protein levels

We first analyzed CAV-1 by western blot in paired normal colonic mucosa and tumor samples from 21 CRC patients. The clinical and molecular characteristics of our cohort are shown in Online Resource 1. The analysis revealed that 16 out of 21 patients (76.2%) had CAV-1 markedly downregulated in the tumor tissue compared to normal mucosa (Fig. 1). Furthermore, we studied the potential association between CAV-1 and clinical and molecular parameters of the patients included in this

Fig. 2 Relative *CAV-1* mRNA expression levels in primary CRC tumor tissues compared to normal mucosa

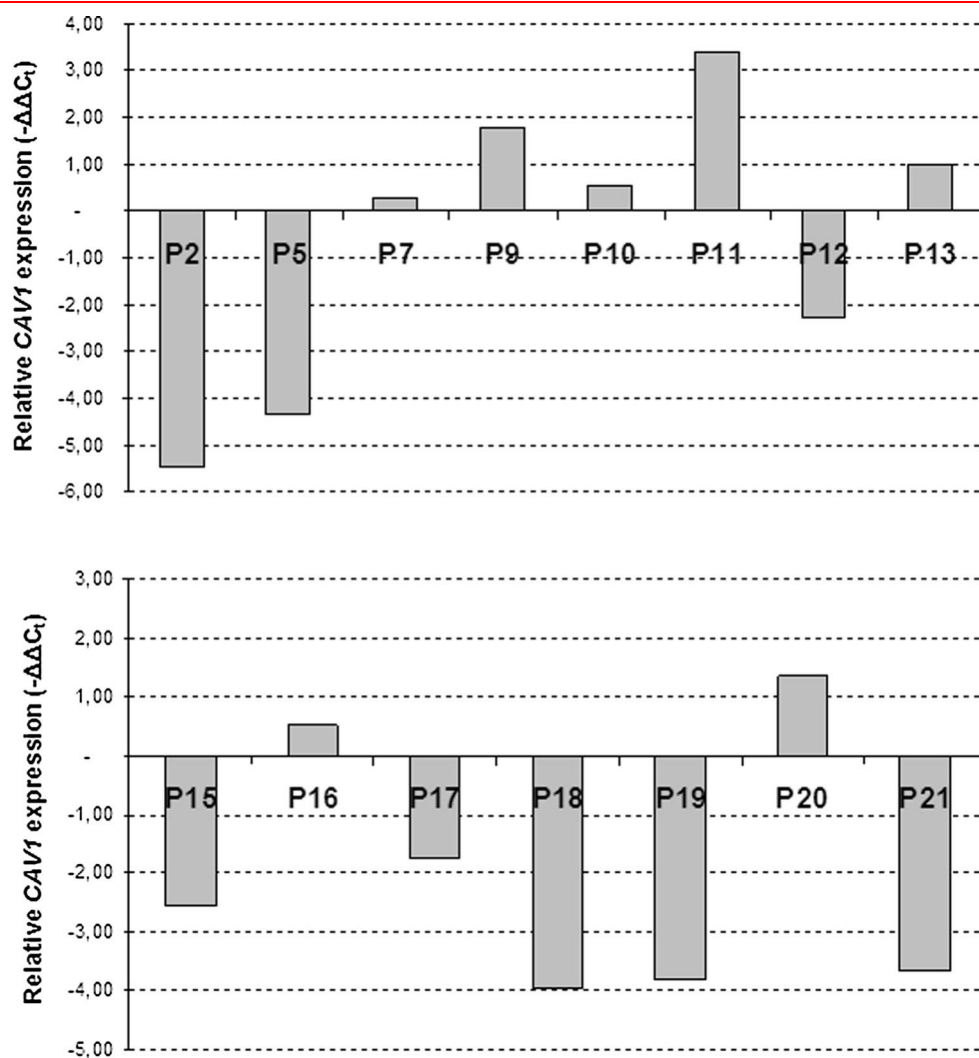
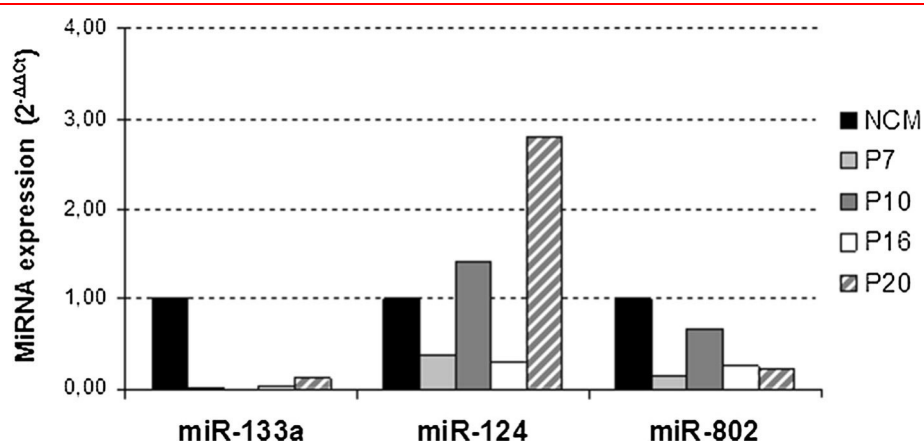


Fig. 3 miRNA expression; NCM, normal colonic mucosa



study. Interestingly, *CAV-1* downregulation was significantly associated with the subgroup of elderly patients ($p = 0.027$), with 12 out of 13 cases (92.3%) showing

this alteration compared to the subgroup of younger patients in which *CAV-1* was found downregulated only in 50% of cases (Table 1).

Lack of correlation between CAV-1 mRNA and protein levels and identification of miR-124 deregulation as one potential contributing alteration

To further investigate both CAV-1 status and its regulatory mechanisms in CRC, we next quantified CAV-1 mRNA expression levels by real-time PCR in tumor tissues and paired normal mucosa from 16 CRC patients of our series. Five cases were excluded because they had not enough material available. Of relevance, we found high mRNA expression in tumor samples from four CRC patients with CAV-1 downregulated at the protein level (P7, P10, P16 and P20) (Fig. 2), suggesting that some epigenetic mechanism could be impairing CAV-1 translation in these cases.

In order to explore the potential involvement of a microRNA-dependent CAV-1 regulation, we quantified the expression levels of microRNAs previously described as CAV-1 regulators such as miR-133a, miR-124 and miR-802 in those cases with low CAV-1 protein and lack of correlation with its mRNA levels. MiR-133a and miR-802 had even lower expression compared to normal mucosa in all patients analyzed. Only miR-124 was found at higher levels in two out of four tumor samples studied, which suggest its potential implication in the CAV-1 translation impairment observed in these cases (Fig. 3). In summary, our results indicate that there is a lack of correlation between CAV-1 protein and mRNA in a subgroup of CRC patients and that miR-124 deregulation could represent a contributing alteration to explain this observation.

Discussion

It has been proposed that a switch of CAV-1 function occurs during CRC progression and that its initial suppressor role in early stages turns to oncogenic in advanced disease. However, the work by Ha et al. described highly variable CAV-1 levels in primary CRC tumors with CAV-1 downregulation in around 45% of stage I–II CRC tumors and only 11% in stage III CRC specimens. These findings are not concordant with our observations, as we detected much higher prevalence for CAV-1 downregulation. However, this issue could be explained by the fact that those authors quantified CAV-1 by real-time PCR, and probably, a number of cases with high CAV-1 mRNA would have resulted in CAV-1 downregulation at the protein level. Therefore, our findings strongly indicate that CAV-1 should be studied at the protein level and that conclusions from RT-PCR studies should be taken with care. In addition, discrepancies observed in works using immunohistochemistry could be due to the reliability of the technique and the antibody used.

Furthermore, it has been reported that an aberrant CAV-1 methylation at precancerous stages would be related to its silencing in CRC development [18]. In a recent work, Dasgupta and colleagues confirmed the methylation of the CAV-1 promoter but also demonstrated that it could be reactivated by histone hyperacetylation [19]. Although these findings could represent a key molecular epigenetic mechanism to inhibit CAV-1 in early stages of CRC and to reactivate it in advanced disease, it cannot explain the lack of correlation observed in patients with a strong CAV-1 protein downregulation and high mRNA levels. Therefore, we hypothesized microRNA-dependent regulation as an additional post-transcriptional CAV-1 mechanism should be playing a relevant role in a set of CRC patients. Thus, we analyzed the expression profile of miR-124, miR-133a and miR-802, as previously demonstrated CAV-1 regulators [20–22], in those CRC cases with lack of correlation between CAV-1 mRNA and protein expression. Importantly, we identified miR-124 upregulation as a potential contributing mechanism to deregulate CAV-1 in CRC patients. However, we did not find any microRNA deregulation in two cases indicating the existence of an additional mechanism controlling CAV-1 at the posttranscriptional levels that remains to be identified.

In conclusion, our results strongly support that CAV-1 is markedly downregulated in patients with early stages of CRC and provides novel findings to understand the regulation of CAV-1 in this disease. The lack of correlation between CAV-1 mRNA and protein in a subgroup of CRC cases could serve to explain some of the discrepancies previously reported in the literature. Moreover, our observations would also indicate the potential relevance of microRNA-dependent CAV-1 regulation in CRC and the role of miR-124 deregulation in this issue. However, further investigation has to be performed to clarify the molecular mechanisms that govern CAV-1 status during CRC progression.

Acknowledgements This work was supported by PI15/00934 grant from “Instituto de Salud Carlos III FEDER.” B.T. is supported by “Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.”

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nwosu ZC, Ebert MP, Dooley S et al (2016) Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective. *Mol Cancer* 15:71
2. Liu P, Rudick M, Anderson RG (2002) Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277:41295–41298

3. Gupta R, Toufaily C, Annabi B (2014) Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer. *Biochimie* 107:188–202
4. Zhang J, Zhang K, Zhou L et al (2016) Expression and potential correlation among Forkhead box protein M1, Caveolin-1 and E-cadherin in colorectal cancer. *Oncol Lett* 12:2381–2388
5. Schwencke C, Braun-Dullaeus RC, Wunderlich C et al (2006) Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: implications for human disease. *Cardiovasc Res* 70:42–49
6. Yang SF, Yang JY, Huang CH et al (2010) Increased caveolin-1 expression associated with prolonged overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *Pathology* 42:438–445
7. Williams TM, Lisanti MP (2005) Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C494–C506
8. Cokakli M, Erdal E, Nart D et al (2009) Differential expression of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation stage, motility and invasion. *BMC Cancer* 9:65
9. Fine SW, Lisanti MP, Galbiati F et al (2001) Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol* 115:719–724
10. Kim HA, Kim KH, Lee RA (2006) Expression of caveolin-1 is correlated with Akt-1 in colorectal cancer tissues. *Exp Mol Pathol* 80:165–170
11. Xue J, Wu XL, Huang XT et al (2015) Correlation of caveolin-1 expression with microlymphatic vessel density in colorectal adenocarcinoma tissues and its correlation with prognosis. *Asian Pac J Trop Med* 8:655–657
12. Bender FC, Reymond MA, Bron C et al (2000) Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* 60:5870–5878
13. Ha TK, Her NG, Lee MG et al (2012) Caveolin-1 increases aerobic glycolysis in colorectal cancers by stimulating HMGA1-mediated GLUT3 transcription. *Cancer Res* 72:4097–4109
14. Mai J, Dosescu J, Sameni M (2005) Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci* 118:1493–1503
15. Yu F, Xie D, Ng SS et al (2015) IFITM1 promotes the metastasis of human colorectal cancer via CAV-1. *Cancer Lett* 368:135–143
16. Kitowska A, Wesslerling M, Seroczynska B et al (2015) Differentiation of high-risk stage I and II colon tumors based on evaluation of CAV1 gene expression. *J Surg Oncol* 112:408–414
17. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408
18. Lin SY, Yeh KT, Chen WT et al (2004) Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res* 24:1645–1650
19. Dasgupta N, Kumar Thakur B, Ta A et al (2015) Caveolin-1 is transcribed from a hypermethylated promoter to mediate colonocyte differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 334:323–336
20. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N et al (2011) Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 38:209–217
21. Butz H, Szabó PM, Khella HW et al (2015) miRNA-target network reveals miR-124 as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behavior by targeting CAV1 and FLOT1. *Oncotarget* 6:12543–12557
22. Lin DH, Yue P, Pan C et al (2011) MicroRNA 802 stimulates ROMK channels by suppressing caveolin-1. *J Am Soc Nephrol* 22:1087–1098

SUPPLEMENTARY INFORMATION**Supplementary Table S1. Clinical and molecular characteristics of the 21 CRC patients included in the study.**

		No. (%)	
Sex			
	Male	15	(71.4)
	Female	6	(28.6)
Age			
	<70	8	(38.1)
	>70	13	(61.9)
T			
	1	1	(4.8)
	2	8	(38.1)
	3	11	(52.3)
	4	1	(4.8)
N			
	0	16	(76.2)
	1	2	(9.5)
	2	3	(14.3)
Stage			
	I	8	(38.1)
	II	8	(38.1)
	III	5	(23.8)
Site of primary tumor			
	Colon	14	(66.7)
	Rectum	7	(33.3)

ARTÍCULO 4: Deregulation of SET is associated with tumor progression and predicts adverse outcome in patients with early-stage colorectal cancer

La desregulación de la oncoproteína SET es una nueva diana molecular en CCR metastásico, sin embargo su papel en la progresión de esta enfermedad así como su potencial impacto clínico en pacientes con CCR localizado no se conoce a ciencia cierta.

En este trabajo hemos estudiado los efectos biológicos de SET en migración, a través de ensayos de cierre de herida y migración a través de membrana transwell, y en crecimiento celular independiente de anclaje, mediante ensayos de formación de colonias en agar blando, tras su modulación ectópica. Se analizó la expresión de SET por inmunohistoquímica en una cohorte de 231 pacientes con CCR sin enfermedad metastásica al diagnóstico, y la expresión del miR-199b fue cuantificada mediante PCR a tiempo real en una serie de casos de nuestra cohorte. Curiosamente, la expresión de SET intensifica la migración celular, afecta en gran medida a la capacidad de formación de colonias, promueve TEM e induce la expresión del protooncogén c-MYC.

Por otro lado, se detectó una sobreexpresión de SET en el 15,4% de los casos y se asoció de manera significativa con un peor estado general definido por la escala ECOG ($p=0.021$) y con progresión en pacientes en estadio II ($p=0.008$). Además, la sobreexpresión de SET predice una menor SG ($p<0.001$) y menor tiempo a la metástasis ($p<0.001$), y su valor pronóstico fue particularmente evidente en los pacientes mayores de 70 años. Así mismo, la baja expresión del miR-199b se identificó como un mecanismo molecular que contribuye a la desregulación de SET en pacientes con CCR localizado.

En conclusión, nuestros datos sugieren que la sobreexpresión de SET es una alteración común en estadios tempranos del CCR, jugando un papel oncogénico asociado con progresión y agresividad, y augurando un mal pronóstico. Por ello, SET emerge como una nueva diana terapéutica con un gran impacto clínico en CCR localizado.

Aportación del doctorando:

Mi contribución como doctoranda se basó en la parte de metodología e investigación de este trabajo y se concretó en el mantenimiento de los cultivos celulares y experimentos de modulación ectópica de SET mediante la transfección transitoria de las líneas celulares SW480 y HT-29 con lipofectamina. Además, realicé la recogida de material y extracciones de RNA y proteínas junto con la ejecución de gran parte de los experimentos de PCR a tiempo real y western blot incluídos en este estudio. Finalmente, llevé a cabo los

experimentos de migración por cierre de herida y los de formación de colonias en agar blando.



Article

Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer

Ion Cristóbal ^{1,2,*†}, Blanca Torrejón ^{1,2,†}, Jaime Rubio ^{1,3}, Andrea Santos ², Manuel Pedregal ^{1,3}, Cristina Caramés ^{1,3} , Sandra Zazo ⁴, Melani Luque ⁴, Marta Sanz-Alvarez ⁴, Juan Madoz-Gúrpide ⁴, Federico Rojo ^{4,*} and Jesús García-Foncillas ^{2,3,*}

¹ Cancer Unit for Research on Novel Therapeutic Targets, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; blanca.torreon@quironsalud.es (B.T.); jaime.rubiop@quironsalud.es (J.R.); manuel.pedregal@quironsalud.es (M.P.); ccarames@fjd.es (C.C.)

² Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; andreasantos.asc@gmail.com

³ Medical Oncology Department, University Hospital “Fundación Jiménez Díaz”, UAM, E-28040 Madrid, Spain

⁴ Pathology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, E-28040 Madrid, Spain; szazo@fjd.es (S.Z.); melani.luque@quironsalud.es (M.L.); marta.sanza@quironsalud.es (M.S.-A.); jmadoz@fjd.es (J.M.-G.)

* Correspondence: ion.cristobal@fjd.es (I.C.); frojo@fjd.es (F.R.); jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu (J.G.-F.); Tel.: +34-915504800 (ext. 2820) (I.C.); +34-915504800 (ext. 2448) (F.R.); +34-915504800 (ext. 2824) (J.G.-F.)

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 12 February 2019; Accepted: 8 March 2019; Published: 12 March 2019



Abstract: SET nuclear proto-oncogene (SET) deregulation is a novel molecular target in metastatic colorectal cancer (CRC). However, its role in CRC progression and its potential clinical impact in early-stage CRC patients remain unknown. Here, we studied the biological effects of SET on migration using wound-healing and transwell assays, and anchorage-independent cell growth using soft agar colony formation assays after ectopic SET modulation. SET was analyzed by immuno-staining in 231 early-stage CRC patients, and miR-199b expression was quantified by real-time PCR in a set of CRC patients. Interestingly, SET enhances cell migration, markedly affects the colony-forming ability, promotes epithelial to mesenchymal transition, and induces the expression of the MYC proto-oncogene (c-MYC) in CRC cells. SET overexpression was detected in 15.4% of cases and was associated with worse Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status ($p = 0.021$) and relapse in stage-II CRC patients ($p = 0.008$). Moreover, SET overexpression predicted shorter overall survival ($p < 0.001$) and time to metastasis ($p < 0.001$), and its prognostic value was particularly evident in elderly patients. MiR-199b downregulation was identified as a molecular mechanism to deregulate SET in patients with localized disease. In conclusion, SET overexpression is a common alteration in early-stage CRC, playing an oncogenic role associated with progression and aggressiveness, and portends a poor outcome. Thus, SET emerges as a novel potential molecular target with clinical impact in early-stage in CRC.

Keywords: SET; protein phosphatase 2A (PP2A); early-stage colorectal cancer (CRC)

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) has the highest incidence rate of all gastrointestinal cancers and is the third most commonly diagnosed of all cancer types and the fourth highest cause of cancer-related deaths worldwide [1]. Disease stage at diagnosis remains the single most critical factor determining

the patient outcome [2]. Though patients with metastatic disease have the worst prognosis, more than 70% of newly diagnosed cases have surgically resectable, localized disease [3–5]. Therefore, further improvements in our knowledge of the molecular mechanisms that govern CRC progression are necessary to prevent metastasis. In particular, identification of novel biomarkers and the development of alternative therapeutic strategies are required to impair disease progression.

The protein phosphatase 2A (PP2A) is a tumor suppressor that is frequently inactivated in human cancer due to its pivotal role in controlling the activation of critical signaling pathways for the tumor cell [6,7]. Several published works have reported that functional inactivation of PP2A is common and has great importance in CRC [8–11], and that overexpression of the endogenous PP2A inhibitor SET [12] is a key molecular mechanism to inhibit PP2A in this disease [13]. SET regulates a wide variety of molecular processes in the cell such as histone acetylation and transcription, migration, stemness, and cell-cycle regulation [14–18]. In addition, the oncoprotein SET modulates the activation status of the transcription factor activator protein-1 (AP-1) deregulates protein kinase B (AKT) signaling, inhibits the DNase activity of NM23-H1, and negatively regulates p53 activity [19–22].

Furthermore, SET has been found to be de-regulated in some solid tumors and leukemias [23–29], and it has been proposed as a novel target for anticancer therapy [30–35]. Of importance, some data in the literature indicate that SET could also be playing a relevant role in CRC through the regulation of the Wingless-type MMTV integration site family (WNT) signaling pathway [36]. Our group reported that SET deregulation determines poor outcome in metastatic CRC patients by promoting cell growth and decreasing sensitivity to standard chemotherapeutic agents such as oxaliplatin and 5-fluorouracil [12]. Regarding the molecular mechanisms responsible for SET deregulation, the transcription factor ecotropic virus integration site-1 (EVI-1) has been reported to promote SET expression in acute myeloid leukemia, and miR-199b has been found to be negatively regulate SET in choriocarcinoma [24,37]. Interestingly, SET was identified as a direct target of miR-199b, and the downregulation of this microRNA was described as the molecular mechanism responsible for SET overexpression in around half of metastatic CRC patients with high SET levels [38].

In this study, we further explore the role of SET in CRC progression and evaluate, for the first time, its potential clinical impact in CRC patients with localized disease. We observed that SET promotes cell migration, colony-forming ability, and epithelial to mesenchymal transition (EMT) in CRC cells. To determine its clinical relevance, we quantified SET in a series of 231 CRC patients without metastatic disease at diagnosis, observing that SET overexpression is a common alteration that is associated with relapse and predicts shorter overall survival and time to metastasis. Moreover, we identified miR-199b downregulation as a contributing molecular mechanism to deregulate SET in early-stage CRC patients.

2. Experimental Section

2.1. Cell Cultures and Transfection

The human CRC cell lines SW480 (ATCC CCL-228) and HT-29 (ATCC HTB-38) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Authentication was done by the authors in all cases (LGC Standards, Wesel, Germany). Cell lines were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS) and were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Media were supplemented with penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (0.1 mg/mL). For transfection experiments, CRC cells were seeded in 6-well plates and transfected with 10 µL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 2 µg of plasmidic vectors or 75 nM of SET-specific siRNAs designed and synthesized by Dharmacon RNA Technologies (Dharmacon, Lafayette, CO, USA).

2.2. Patient Samples

Primary colorectal tissues were surgical resection specimens from CRC tumors obtained from Fundacion Jimenez Diaz Biobank (BFJD, Madrid, Spain). The study comprised consecutive

formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples from 247 CRC patients without metastatic CRC, retrospectively selected from 2001 to 2012 according to the following criteria: Adenocarcinoma, operable disease, no neo-adjuvant therapy, sufficient available tissue, available clinical follow-up data, and metastatic disease. Tumor, Node, Metastases (TNM) staging was performed using the 7th American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for CRC. Clinical data were collected from medical records by oncologists (MP, CC, and JR). KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS) mutational status was determined by Cobas KRAS Mutation Test kit (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) following the manufacturer's procedures. Tissue microarrays (TMA) were constructed. Representative areas of each tumor were carefully selected and three tissue cores (1 mm diameter) were obtained using a TMA workstation (T1000 Chemicon). Samples were taken anonymously. The ethical committee and institutional review board approved the project.

2.3. Wound-Healing Assay

A total of 8×10^5 cells per well were seeded in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h in complete medium. The monolayer was artificially injured by scratching across the plate with a 10 μ L pipette tip. Wells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove detached cells and wound healing was monitored using a Leica DMI1 (Leica, Wetzlar, Germany) microscope and the image acquisition software Leica Application Suite version 4.5. Images were captured at the beginning and at regular intervals during cell migration to close the wound. Comparisons were performed to quantify the migration rate of the cells between the different experimental conditions. Relative cell migration are represented in the histograms considering the percentage of healed area after ectopic SET silencing or overexpression and compared to control conditions.

2.4. Transwell Migration Assay

Migration assays were performed using 24-well plates with transwell permeable supports of 6.5 mm insert and a polycarbonate membrane with an 8- μ m pore size (Costar 3422, Corning Inc., Corning, NY, USA). Cells were seeded in the upper chamber at 2×10^4 cells/mL in 0.1 mL of serum-free RPMI-1640 media. A volume of 0.8 mL of media supplemented with 10% FBS was placed in the bottom well as a chemo-attractant. After incubation for 24 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂, migrated cells on the lower surface were stained using crystal violet and counted under a light microscope.

2.5. Colony-Forming Assay

Experiments were performed in 6-well plates coated with 3 mL of 0.6% soft agarose (Sigma, St. Louis, MO, USA) in medium. A total of 5×10^3 cells were suspended in 0.3% agarose in medium and plated in triplicates over the pre-coated wells. Fresh medium was supplied twice a week. After 10 days, colonies were stained with MTT (M-565, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 4 h at 37 °C. Then, colonies were fixed by adding dimethyl sulfoxide (DMSO) overnight at 37 °C. Colony numbers were determined from triplicates and three independent experiments were carried out for each condition and cell line.

2.6. Western Blot Analysis

Protein extracts were isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following manufacturer's indications, clarified (12,000 \times g, 15 min, 4 °C), denatured and subjected to SDS-PAGE and Western-blot. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-SET (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-E-cadherin (24E10), anti-N-cadherin (D4R1H) and anti-Vimentin (D21H3) (Cell Signaling Technology, Leide, The Netherlands), rabbit polyclonal anti-c-myc (Ab32072) (Abcam, Cambridge, UK), and mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Proteins were detected with the appropriate secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis, MO, USA) by chemiluminescence using Tropix CSPD and Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.7. Immunohistochemistry

Tissue sections (3 μ m) were mounted on positively charged glass slides. After de-paraffinization in xylene and graded alcohols, heat antigen retrieval was performed in EDTA-based buffer, pH9 (Dako). Endogenous peroxidase was blocked by 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides were incubated with the same primary antibody used against SET as described above, for 60 min at room temperature, followed by appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (Flex+, Dako). Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. All staining's were performed in a Dako Autostainer. Sections incubated with normal non-immunized rabbit immunoglobulins were used as negative controls. As a positive control, a section of colorectal tumor with known expression of SET was used. SET antibody sensitivity (1:5000) had been calculated in a range of crescent dilutions of the primary antibody. Specificity was confirmed in a set of paired fresh frozen and FFPE samples were processed by Western blot and immunohistochemistry (IHC). Only the membrane of epithelial cells, but not stromal cells, was evaluated for SET expression by two pathologists blinded to clinical data (FR and SZ). A semi-quantitative histoscore was calculated by estimating the percentage of tumor cells positively stained with low, medium, or high staining intensity. The final score was determined after applying a weighting factor to each estimate. The following formula was used: Histoscore = (low %) \times 1 + (medium %) \times 2 + (high %) \times 3 and the results ranged from 0 to 300.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 20 for windows (SPSS Inc, Chicago, IL USA). Overall survival (OS) was defined as the time from the date of surgery to the date of death from any cause or last follow-up. Time to metastasis (TTM) was defined as the time from surgery until distant recurrence in those cases with metachronous metastases. Kaplan-Meier plots and survival comparisons were performed by means of log-rank test if the proportional hazard assumption was fulfilled and Breslow otherwise. The Cox proportional hazards model was adjusted taking into consideration significant parameters in the univariate analysis. The cutoff point for SET expression was determined as previously described for metastatic CRC [12]. This work was carried out in accordance with Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) guidelines [39]. Data represented for transfection experiments are mean of three independent experiments \pm s.d. Statistical comparisons were carried out by 2-sided *t*-test analyses. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

2.9. Quantification of miRNA Expression Levels

Total RNA was isolated using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Samples were reverse transcribed using the TaqManHMicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and mature miRNAs were quantified by quantitative real-time RT-PCR using TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), specific for miR-199b and U6B as an internal control. Analysis of relative gene expression data was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [40], where $\Delta\Delta C_T = (C_{T,Target\ Gene} - C_{T,U6B})_{Cell\ Line} - (C_{T,Target\ Gene} - C_{T,U6B})_{Normal\ Control}$.

3. Results

3.1. SET Plays a Relevant Role in Regulating Cell Migration of CRC cells

To investigate the biological significance of SET in CRC progression, we first assessed the effects of an ectopic SET modulation on cell migration. Interestingly, we observed significantly decreased migration in SW480 cells after SET silencing in comparison with those cells transfected with a negative control siRNA (Figure 1A). Similar results were obtained with the HT-29 cell line (Figure S1A). In concordance with these results, SET overexpression in both SW480 and HT-29 cells enhanced cell migration compared

to cells transfected with an empty vector (Figure 1B and Figure S1B). In order to exclude a possible functional effect on off-targets, we performed a rescue experiment with a SET expression vector, as well as a time-course analysis in both SW480 (Figure S2) and HT-29 cells (Figure S3), observing that ectopic SET expression restored migration capability in both cell lines after SET silencing.

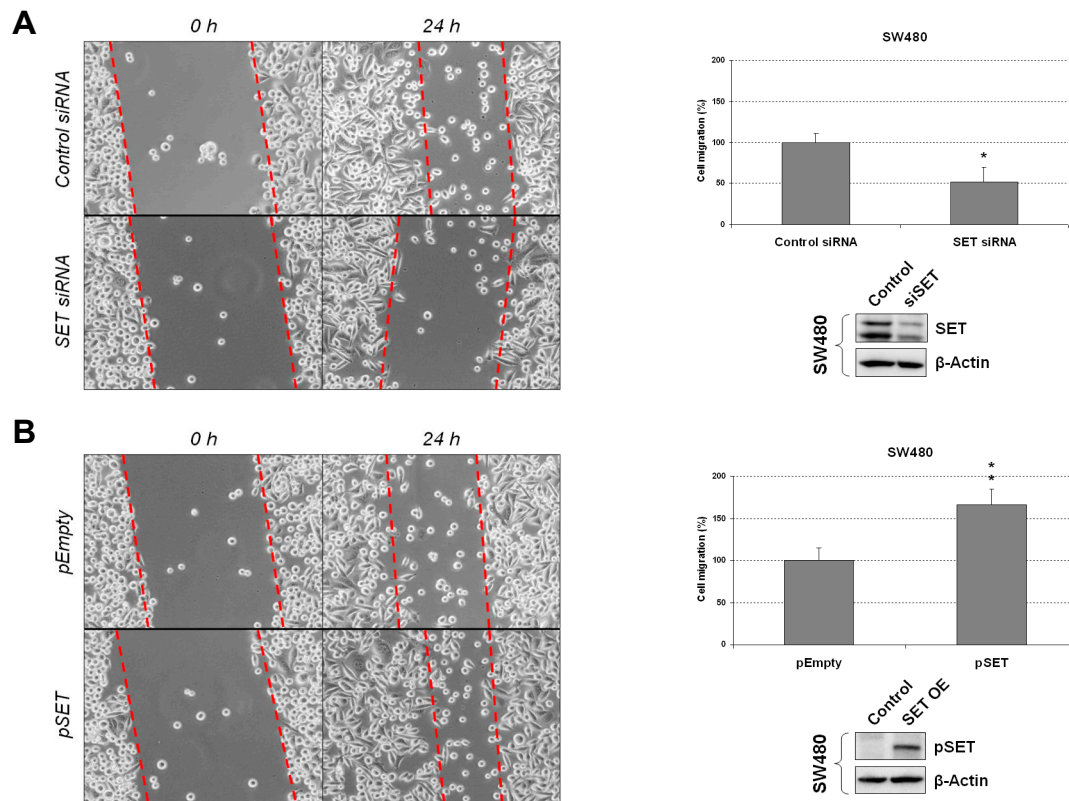


Figure 1. SET modulates cell migration in colorectal cancer (CRC) cells. Wound-healing assay showing migration in SW480 cells after ectopic (A) SET silencing or (B) SET overexpression. Dashed lines represent the migration border; OE: Overexpression; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

To further confirm the role of SET in modulating cell migration in CRC cells, we carried out a transwell migration assay using SW480 and HT29 cells. Interestingly, SET silencing dramatically decreased transwell migration in both cell lines compared to negative control cells (Figure 2), thereby evidencing that SET deregulation plays a relevant role in regulating the migration of CRC cells. In order to exclude a possible functional effect on off-targets we performed a rescue experiment of transwell with a SET expression vector. As expected, we observed that ectopic expression of SET restored cell migration to levels similar to control conditions in both SW480 and HT-29 cells (Figure S4).

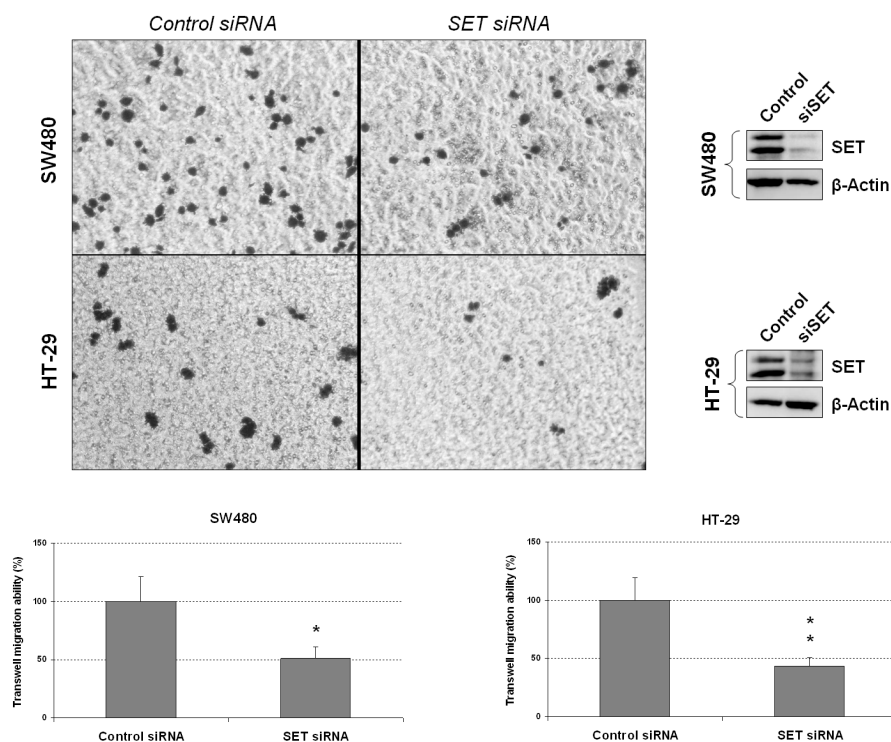


Figure 2. SET silencing inhibits transwell migration in CRC cells. Transwell migration assay in SW480 and HT-29 cells after SET silencing; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3.2. Deregulation of SET Markedly Affects Colony-Forming Ability and Regulates EMT of CRC Cells

In order to further explore the potential significance of SET in CRC progression and aggressiveness, we next performed colony-formation assays in soft agar to analyze whether SET deregulation can alter the malignancy of CRC cells measured as anchorage-independent cell growth. We observed that colony formation was markedly impaired in HT-29 cells after SET silencing; conversely, colony-forming ability was found to be significantly enhanced in HT-29 cells ectopically expressing SET compared to normal controls (Figure 3). While these experiments were also performed in SW480 cells, this cell line failed to form colonies in any of the conditions tested.

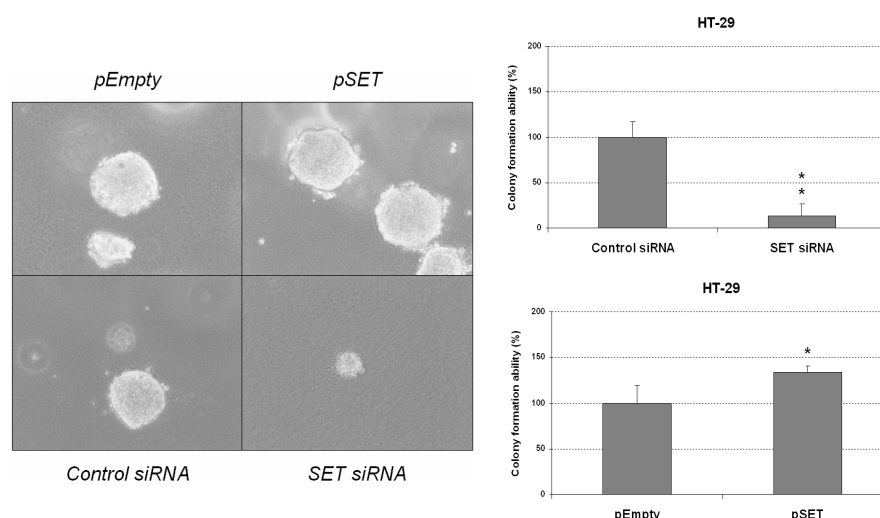


Figure 3. SET deregulation affects CRC colony-forming ability. Colony-forming assays showing the effect of SET silencing and SET overexpression on the anchorage-independent cell growth of HT-29 cells; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Furthermore, we analyzed the potential role of SET regulating EMT and proteins involved in CRC progression and metastasis such as c-MYC. Interestingly, we found that SET silencing resulted in higher E-cadherin levels concomitant with a decrease in the expression of proteins of a mesenchymal phenotype such as N-cadherin and vimentin in SW480 and HT-29 cells. In concordance with these results, ectopic SET expression decreased E-cadherin levels and increased N-cadherin and vimentin expression (Figure S5). Moreover, we also analyzed the expression levels of c-MYC, an oncoprotein largely involved in progression to metastatic disease since it positively regulates EMT during carcinogenesis [41]. Interestingly, we observed that SET positively regulates c-MYC expression in both SW480 and HT-29 cell lines (Figure S5). Altogether, these results appear to indicate that SET is involved in CRC aggressiveness by promoting colony-forming ability and EMT of CRC cells.

3.3. Prevalence of SET Overexpression in Early-Stage CRC and Its Association with Molecular and Clinical Parameters

To study the prevalence and clinical significance of SET overexpression, we quantified the expression of SET by immunohistochemistry in a cohort of 247 CRC patients without metastatic disease at diagnosis. Patient characteristics are presented in Table S1, and immuno-histochemical detection of SET is shown in Figure S6A. Interestingly, SET overexpression was found in 34 of 231 cases (15.4%). We found this alteration to be associated with worse ECOG performance status (33.3% vs. 13.2%, $p = 0.021$). As ECOG status is influenced by tumor stage and age, we also analyzed the association of ECOG status with these parameters, observing a correlation between high ECOG and stage III ($p = 0.014$). Moreover, these patients are mainly older, but in this case, statistical significance was not achieved ($p = 0.060$), probably due to the low number of cases with high ECOG (Table S2). While the prevalence of SET overexpression was higher in patients with stage III than in those cases with stage I-II disease, the differences did not reach statistical significance in this case (17.7 % vs. 11%, $p = 0.156$). The association between SET overexpression and molecular and clinical parameters are included in Table 1.

Table 1. Association between SET and clinical and molecular parameters in 247 CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

	No. Cases	No. SET Low (%)		No. SET High (%)		<i>p</i>
SET	247	209 (84.6)		38 (15.4)		
Sex	247	209		38		0.674
Male	155	130	(83.9)	25	(16.1)	
Female	92	79	(85.9)	13	(14.1)	
Age	236	199		37		0.349
<70	86	70	(81.4)	16	(18.6)	
>70	150	129	(86)	21	(14)	
ECOG	223	190		33		0.021
0–1	205	178	(86.8)	27	(13.2)	
2–3	18	12	(66.7)	6	(33.3)	
T	247	209		38		0.824
1	7	6	(85.7)	1	(14.3)	
2	48	43	(89.6)	5	(10.4)	
3	155	128	(82.6)	27	(17.4)	
4	29	25	(86.2)	4	(13.8)	
x	8	7	(87.5)	1	(12.5)	

Table 1. Cont.

	No. Cases	No. SET Low (%)	No. SET High (%)	<i>p</i>
N	247	209	38	0.421
0	117	102 (87.2)	15 (12.8)	
1	67	56 (83.6)	11 (16.4)	
2	44	34 (77.3)	10 (22.7)	
x	19	17 (89.5)	2 (10.5)	
Stage	247	208	38	0.302
I–II	117	102 (87.2)	15 (12.8)	
III	130	107 (82.3)	23 (17.7)	
Site of primary tumor	241	203	38	0.699
Colon	165	140 (84.8)	25 (15.2)	
Rectum	76	63 (82.9)	13 (17.1)	
Progression (local or distant)	247	209	38	0.144
No	156	136 (87.2)	20 (12.8)	
Yes	91	73 (80.2)	18 (19.8)	

We also analyzed the potential association of SET overexpression with relapse (local or distant), though our findings were not statistically significant. We next stratified our cohort by stage; to our surprise, we found that SET overexpression strongly associates with relapse in those CRC patients with stage II at diagnosis ($p = 0.008$), whereas significance was far from being achieved in the subgroup of CRC patients with stage III disease ($p = 0.882$) (Table 2).

Table 2. Association between SET and progression (local or distant) in 207 stages II–III CRC patients.

Stage II	No. Cases	No. SET Low (%)	No. SET High (%)	<i>p</i>
Progression	77	66	11	0.008
No	59	54 (81.8)	5 (45.5)	
Yes	18	12 (18.2)	6 (54.5)	
Stage III	No. Cases	No. SET low (%)	No. SET high (%)	<i>p</i>
Progression	130	107	23	0.882
No	64	53 (49.5)	11 (47.8)	
Yes	66	54 (50.5)	12 (52.2)	

3.4. Clinical Significance of SET Overexpression in Early-Stage Colorectal Cancer

For survival analyses, we included 149 cases with stages II and III for whom clinical follow-up data were available, 89 were male and 60 female, with a median of age and OS of 72 years (range: 36–93) and 66.4 months, respectively. Patients with stage I CRC were excluded due to the limited number of cases with clinical data available. Interestingly, we found that the subgroup of patients in whom SET was overexpressed showed a substantially shorter OS (57 vs. 113.2 months, $p < 0.001$) (Figure 4A). We observed that in the subgroup of cases that developed metachronous metastases ($n = 87$), SET overexpression predicted a significantly shorter time to metastasis ($p < 0.001$) (Figure 4B). As in previous reported data showing that SET overexpression predicts poor outcome in metastatic CRC, this alteration was also predictive of shorter time to progression from metastatic diagnosis ($p = 0.001$) (Figure S6B). Moreover, multivariate analysis demonstrated that SET overexpression is an independent predictor of poor outcome in our cohort (Table 3).

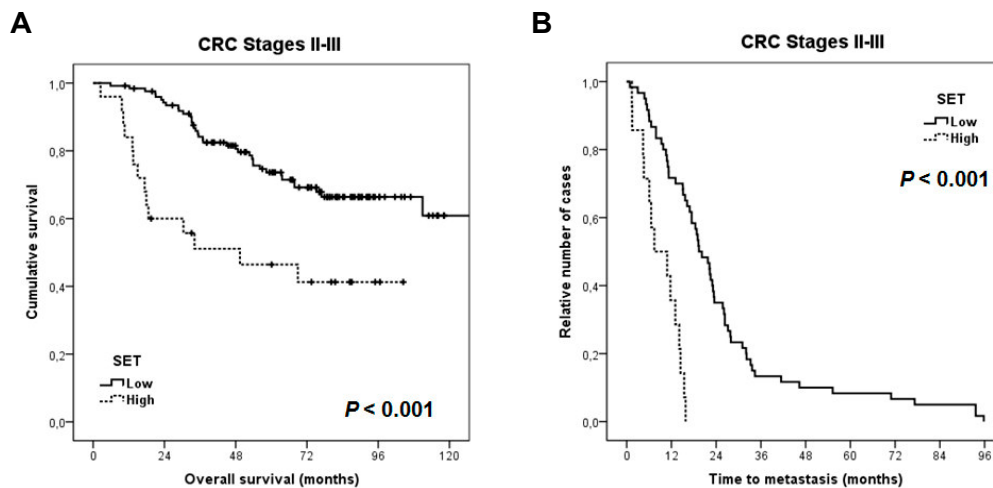


Figure 4. Kaplan-Meier analyses for SET expression in early-stage CRC patients: (A) Overall survival; and (B) time to metastasis ($n = 87$).

Table 3. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 149 patients with early-stage CRC.

	Univariate OS Analysis				Multivariate OS Cox Analysis			
	HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Age				0.319				-
<70	1.000							
>70	1.352	0.747	2.445		-	-		
Stage				0.003				0.235
II	1.000				1.000			
III	3.421	1.540	7.601		1.956	0.646	5.926	
ECOG				<0.001				<0.001
0–1	1.000				1.000			
2–3	2.797	1.975	3.961		2.653	1.845	3.814	
T				0.002				0.057
1–2	1.000				1.000			
>2	1.785	1.226	2.599		1.488	0.989	2.240	
N				0.001				0.275
0–1	1.000				1.000			
2–x	1.599	1.223	2.091		1.263	0.830	1.921	
SET				0.001				0.010
No	1.000				1.000			
Yes	2.873	1.547	5.335		2.387	1.229	4.634	

OS: overall survival; CI: confidence interval, and HR: hazard-ratio. Bold: $p < 0.01$.

We next analyzed the clinical impact of SET overexpression after stratifying our cohort by age. Interestingly, we observed that the prognostic impact of SET was significant in the subgroup of elderly patients (45.4 vs. 103.9 months, $p < 0.001$), whereas significance was not achieved in the subgroup of younger patients (45.4 vs. 103.9 months, $p < 0.001$) (Figure S6C). Of note, multivariate analysis demonstrated that SET overexpression was an unfavorable independent factor associated with OS in the subgroup of elderly patients (Table S3).

3.5. MiR-199b Downregulation is a Contributing Alteration to Deregulate SET in Localized Colorectal Cancer

Previous data reporting that miR-199b directly targets SET in CRC and that miR-199b downregulation is a frequent event that facilitates SET overexpression in metastatic CRC prompted us to analyze the potential contribution of this alteration to deregulate SET also in early-stage CRC.

Thus, we analyzed the expression levels of miR-199b in 29 patients from our cohort with sufficient available material. Patient characteristics are presented in Table S4. We observed SET overexpression in seven cases and miR-199b downregulation in four out of 29 cases. Interestingly, we found that miR-199b downregulation was significantly associated with SET overexpression ($p = 0.010$) (Table S5). To further investigate the potential role of miR-199b in regulating SET, we next compared the miR-199b expression profiles between the subgroups of SET-overexpressing and non-overexpressing patients. In a noteworthy finding, we observed that miR-199b was significantly downregulated in the subgroup of cases with high SET expression ($p = 0.004$) (Figure S7). Therefore, miR-199b downregulation is a molecular mechanism that contributes to SET deregulation in CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

4. Discussion

The upregulation of the SET oncogene has been described in several tumor models, and over time it has emerged as a promising molecular target for alternative therapeutic strategies in these cancers [23–35]. Our previous findings showed that PP2A inhibition is a frequent event in CRC, and we identified SET deregulation as a key mechanism to inhibit PP2A [8]. Moreover, we observed that SET promotes cell proliferation and colonosphere formation, impairing PP2A antitumor activities and modulating the sensitivity of CRC cells to oxaliplatin treatment. Clinically, we showed that SET overexpression is a recurrent alteration that predicts adverse outcome and induces decreased sensitivity to oxaliplatin in metastatic CRC. However, its potential significance in CRC progression and in early-disease stages remains to be investigated. Altogether, existing data led us to hypothesize that SET could also play an important oncogenic role in CRC progression, regulating both migration and colony-forming capabilities, as well as having clinical impact in the early stages of the disease.

In order to study the functional relevance of SET deregulation in CRC progression, we ectopically modulated SET in two different CRC cell lines and observed that SET silencing induced a decrease in cell migration and anchorage-independent cell growth in both cell lines. In contrast, SET-overexpressing CRC cells showed increased migration, colony-forming abilities, and EMT and c-MYC levels (Figures 1–3 and Figures S1–S5). These results indicate that SET deregulation plays a potential oncogenic role in CRC progression.

To further investigate the significance of SET deregulation in CRC, we evaluated its expression in earlier stages of CRC, studying a cohort of 231 CRC patients without metastatic disease. Interestingly, SET overexpression had a lower prevalence in this cohort (15.4%) (Table 1) compared to that previously reported for metastatic CRC (24.8%) [12]. In agreement with previous data on metastatic CRC, SET overexpression was found to be associated with worse ECOG performance. However, this alteration was significantly associated with those metastatic CRC cases with colon tumors (31.8% vs. 11.8%), whereas, in the present study, we observed even higher frequency in the subgroup of patients with rectal tumors (15.2% vs. 17.1%). Therefore, the prevalence of this alteration does not undergo significant changes in rectal cancer, but seems to progressively enhance its prevalence during the disease progression in patients with colon tumors. The potential significance of this observation should be explored in future investigations. Moreover, the prevalence of SET overexpression in the subgroup of patients with metachronous metastases was 16.1%, which is markedly lower than the prevalence of 28.1% previously reported in CRC patients with synchronous metastases at diagnosis [12].

The fact that SET overexpression only associates with relapse in those cases with stage-II disease could be due to the fact that stage III encompasses patients with more advanced disease, where the presence of this alteration could be a less relevant event in the effort to determine relapse than in those cases with stage-II CRC. However, the number of cases with stage II and progression included in our study is still very low and represents a relevant limitation. Therefore, further validation of our observations in forthcoming studies is required to confirm the clinical impact of SET predicting relapse in CRC stage II. In addition, overexpression of SET was significantly associated with shorter time to metastasis and with time to progression from metastatic diagnosis in the subgroup of patients who

develop distant relapse (Figure 4), further suggesting that this alteration indicates more aggressive disease. Our results also show that SET overexpression predicts shorter overall survival and that the clinical impact on prognosis is especially significant in the subgroup of patients older than 70 years of age. Despite the fact that CRC is a disease of the elderly, with a median age of over 70 years, gradual improvements in therapy have mainly impacted the subgroup of younger patients, likely due to both patient and disease-specific factors. It would therefore be very relevant to identify novel alterations that can aid in predicting prognosis in this subgroup of CRC patients and can be used to develop novel targeted therapies. Our results suggest that SET overexpression predicts poor outcome in elderly CRC patients and that this overexpression could also be predictive of a clinical benefit derived from the use of SET targeting therapies such as the PP2A activator FTY720 or specific SET antagonists [30–34].

As with previous observations in metastatic CRC, which evidenced how miR-199b was downregulated in around 50% of SET-overexpressing cases, here we observed that miR-199b downregulation was significantly associated with SET overexpression and that 4 out of 7 CRC patients with SET overexpression showed reduced miR-199b levels (Table S4). Moreover, total miR-199b expression levels were inversely correlated with SET in our cohort (Figure S6), a finding which further strengthens the case for the role played by miR-199b in regulating SET in early-stage CRC patients. These results may also indicate that other molecular alterations contribute to the deregulation of SET in those cases with SET OE and normal miR-199b expression, though this issue will be investigated in forthcoming papers.

Interestingly, our findings demonstrate a key role of SET in cancer progression mediating cell migration, colony-formation and EMT but these observations for SET in CRC have to be also evaluated in other tumor models with SET deregulation. Moreover, these findings are in concordance with the previously reported role of SET in migration [15], but the potential role of Rac-1 in this case remains to be explored in future studies. Furthermore, we show here the potential impact of SET as a novel molecular target in CRC. In this regard, the use of SET antagonists such as OP449 and FTY720 have emerged in the last years as novel therapeutic approaches in human tumors with SET overexpressed and could also be useful in early-stage CRC patients. OP449 is a specific, cell-penetrating peptide against SET, which has shown anticancer properties in leukemia, prostate, breast and gastric cancers [18,35,42,43], but its potential usefulness in CRC remains to be evaluated. FTY720 is an immunosuppressant currently used in the sclerosis multiple, which has demonstrated potent antitumor effects in many cancers, including CRC [44].

5. Conclusions

In conclusion, we show that SET overexpression is a common alteration that contributes to CRC progression, thereby enhancing both cell migration and anchorage-independent cell growth of CRC cells. Moreover, SET overexpression predicts poor outcome, and its prognostic value is particularly significant in patients older than 70 years of age. We have further identified the key function likely played by miR-199b downregulation as a molecular mechanism involved in SET deregulation in many of the SET-overexpressing cases. Our results indicate that SET could be used to anticipate undesirable relapses in stage-II CRC patients and highlight the potential impact of SET inhibition as a novel therapeutic strategy in CRC, which needs to be fully clarified in forthcoming studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/3/346/s1>, Figure S1: SET modulates cell migration in CRC cells, Figure S2: Time-course analysis of a wound healing assay in SW480 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression, Figure S3: Time-course analysis of a wound healing assay in HT-29 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression, Figure S4: Ectopic SET expression restores transwell migration in CRC cells with SET silenced, Figure S5: Clinical impact of SET in time to progression from metastatic diagnosis and in the cohort stratified by age, Figure S6: Box-plot showing miR-199b expression levels in patients with ($n = 7$) and without ($n = 22$) SET overexpression, Table S1: Clinical and molecular characteristics of a series of 231 CRC patients without metastatic disease at diagnosis, Table S2: Association of ECOG status with age and stage parameters, Table S3: Univariate and multivariate Cox analyses in the subgroup of elderly patients with early-stage CRC ($n = 81$), Table S4: Statistical correlation between SET overexpression and miR-199b downregulation in 29 early-stage CRC.

Author Contributions: Conceptualization, I.C. and J.G.-F.; methodology, I.C., A.S., S.Z. and B.T.; software, M.P. and J.R.; formal analysis, I.C., M.L. and M.S.-A.; investigation, I.C., B.T., A.S.; writing, original draft preparation, I.C. and C.C.; writing, review and editing, J.M.-G. and F.R.; funding acquisition, F.R. and J.G.-F.

Funding: This research was funded by PI15/00934 and PI16/01468 grants from “Instituto de Salud Carlos III FEDER”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

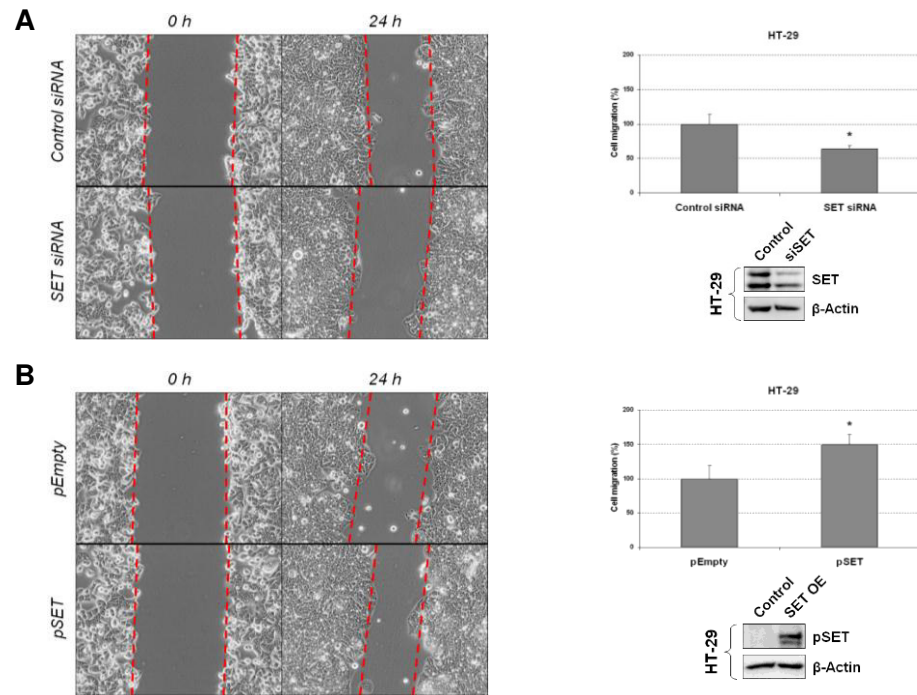
1. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69–90. [[CrossRef](#)]
2. El Zouhairi, M.; Charabaty, A.; Pishvaian, M.J. Molecularly targeted therapy for metastatic colon cancer: Proven treatments and promising new agents. *Gastrointest. Cancer Res.* **2011**, *4*, 15–21. [[PubMed](#)]
3. Lermos, C.; Sack, U.; Schmid, F.; Juneja, M.; Stein, U. Anti-metastatic treatment in colorectal cancer: Targeting signaling pathways. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 841–863. [[CrossRef](#)]
4. Lombardi, L.; Morelli, F.; Cinieri, S.; Santini, D.; Silvestris, N.; Fazio, N.; Orlando, L.; Tonini, G.; Colucci, G.; Maiello, E. Adjuvant colon cancer chemotherapy: Where we are and where we'll go. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36*, S34–S41. [[CrossRef](#)]
5. Gill, S.; Blackstock, A.W.; Goldberg, R.M. Colorectal cancer. *Mayo Clin. Proc.* **2007**, *82*, 114–129. [[CrossRef](#)]
6. Mumby, M. PP2A: Unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* **2007**, *130*, 21–24. [[CrossRef](#)]
7. Westermarck, J.; Hahn, W.C. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 152–160. [[CrossRef](#)]
8. Cristóbal, I.; Manso, R.; Senín, C.; Borrero, A.; Martínez-Useros, J.; Rodríguez, M.; Zazo, S.; Aguilera, O.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 938–947. [[CrossRef](#)]
9. Carmen Figueroa-Aldariz, M.; Castañeda-Patlán, M.C.; Santoyo-Ramos, P.; Zentella, A.; Robles-Flores, M. Protein phosphatase 2A is essential to maintain active Wnt signaling and its A β tumor suppressor subunit is not expressed in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2014**, *54*, 1430–1441. [[CrossRef](#)]
10. Cristóbal, I.; Manso, R.; Rincon, R.; Carames, C.; Zazo, S.; Del Pulgar, T.G.; Cebrián, A.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 756–762. [[CrossRef](#)]
11. Cristóbal, I.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Caramés, C.; Del Puerto-Nevado, L.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1823–1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cristóbal, I.; Rincon, R.; Manso, R.; Carames, C.; Zazo, S.; Madoz-Gurpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 347–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, M.; Makkinje, A.; Damuni, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11059–11062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Seo, S.B.; McNamara, P.; Heo, S.; Turner, A.; Lane, W.S.; Chakravarti, D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **2001**, *104*, 119–130. [[CrossRef](#)]
15. ten Klooster, J.P.; Leeuwen, I.; Scheres, N.; Anthony, E.C.; Hordijk, P.L. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J.* **2007**, *26*, 336–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Canela, N.; Rodríguez-Vilarrupla, A.; Estanyol, J.M.; Diaz, C.; Pujol, M.J.; Agell, N.; Bachs, O. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1158–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cervoni, N.; Detich, N.; Seo, S.B.; Chakravarti, D.; Szyf, M. The oncoprotein Set/TAF-1 β , an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25026–25031. [[CrossRef](#)]

18. Enjoji, S.; Yabe, R.; Tsuji, S.; Yoshimura, K.; Kawasaki, H.; Sakurai, M.; Sakai, Y.; Takenouchi, H.; Yoshino, S.; Hazama, S.; et al. Stemness Is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 554–563. [[CrossRef](#)]
19. Al-Murrani, S.W.; Woodgett, J.R.; Damuni, Z. Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 293–298. [[CrossRef](#)]
20. Fan, Z.; Beresford, P.J.; Oh, D.Y.; Zhang, D.; Lieberman, J. Tumor suppressor NM23- H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **2003**, *112*, 659–672. [[CrossRef](#)]
21. Kim, J.Y.; Lee, K.S.; Seol, J.E.; Yu, K.; Chakravarti, D.; Seo, S.B. Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β represses p53 activity. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 75–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Liu, G.-P.; Wei, W.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Shi, H.-H.; Yin, J.; Yao, X.-Q.; Peng, C.-X.; Hu, J.; Wang, Q.; et al. I(2)(PP2A) regulates p53 and Akt correlatively and leads the neurons to abort apoptosis. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 254–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Neviani, P.; Santhanam, R.; Trotta, R.; Notari, M.; Blaser, B.W.; Liu, S.; Mao, H.; Chang, J.S.; Galletta, A.; Uttam, A.; et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 355–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cristobal, I.; Garcia-Orti, L.; Cirauqui, C.; Cortes-Lavaud, X.; Garcia-Sanchez, A.; Calasanz, M.J.; Odero, M.D. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **2012**, *97*, 543–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ekmekci, S.S.; Ekmekci, C.G.; Kandilci, A.; Gulec, C.; Akbiyik, M.; Emrence, Z.; Abaci, N.; Karakas, Z.; Agaoglu, L.; Unuvar, A.; et al. SET oncogene is upregulated in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Tumori* **2012**, *98*, 252–256. [[CrossRef](#)]
26. Leopoldino, A.M.; Squarize, C.H.; Garcia, C.B.; Almeida, L.O.; Pestana, C.R.; Sobral, L.M.; Uyemura, S.A.; Tajara, E.H.; Silvio Gutkind, J.; Curti, C. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. *Oral Oncol.* **2012**, *48*, 1106–1113. [[CrossRef](#)]
27. Christensen, D.J.; Chen, Y.; Oddo, J.; Matta, K.M.; Neil, J.; Davis, E.D.; Volkheimer, A.D.; Lanasa, M.C.; Friedman, D.R.; Goodman, B.K.; et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non- Hodgkin lymphoma: A predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood* **2011**, *118*, 4150–4158. [[CrossRef](#)]
28. Hung, M.-H.; Chen, Y.-L.; Chu, P.-Y.; Shih, C.-T.; Yu, H.-C.; Tai, W.-T.; Shiau, C.-W. Upregulation of the oncoprotein SET determines poor clinical outcomes in hepatocellular carcinoma and shows therapeutic potential. *Oncogene* **2016**, *35*, 4891–4902. [[CrossRef](#)]
29. Zheng, G.; Lu, M.; Liu, H.; Gu, Y.; Wang, H.; Yin, J.; Zhang, Z.; Wang, C.; He, Z. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14913–14925.
30. Switzer, C.H.; Cheng, R.Y.S.; Vitek, T.M.; Christensen, D.J.; Wink, D.A.; Vitek, M.P. Targeting SET/I2PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene* **2011**, *30*, 2504–2513. [[CrossRef](#)]
31. Mukhopadhyay, A.; Tabanor, K.; Chaguturu, R.; Aldrich, J.V. Targeting inhibitor 2 of protein phosphatase 2A as a therapeutic strategy for prostate cancer treatment. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14*, 962–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hung, M.-H.; Wang, C.-Y.; Chen, Y.-L.; Chu, P.-Y.; Hsiao, Y.-J.; Tai, W.-T.; Chao, T.-T.; Yu, H.-C.; Shiau, C.-W. SET antagonist enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by reactivating protein phosphatase 2A. *Oncotarget* **2016**, *7*, 638–655. [[CrossRef](#)]
33. Cheneval, O.; D'Souza, C.; Henriques, S.T.; Wang, C.K.; Chan, L.Y.; Bokil, N.J.; Sweet, M.J.; Craik, D.J. Using the MCoTI-II Cyclotide Scaffold To Design a Stable Cyclic Peptide Antagonist of SET, a Protein Overexpressed in Human Cancer. *Biochemistry* **2016**, *55*, 396–405.
34. Hung, M.H.; Chen, K.F. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shlomai, G.; Zelenko, Z.; Antoniou, I.M.; Stasinopoulos, M.; Tobin-Hess, A.; Vitek, M.P.; Leroith, D.; Gallagher, E.J. OP449 inhibits breast cancer growth without adverse metabolic effects. *Endocr. Relat. Cancer* **2017**, *24*, 519–529. [[CrossRef](#)]

36. Dong, L.; Zhu, J.; Wen, X.; Jiang, T.; Chen, Y. Involvement of SET in the Wnt signaling pathway and the development of human colorectal cancer. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1203–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chao, A.; Tsai, C.-L.; Wei, P.-C.; Hsueh, S.; Chao, A.-S.; Wang, C.-J.; Tsai, C.-N.; Lee, Y.-S.; Wang, T.-H.; Lai, C.-H. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett.* **2010**, *291*, 99–107. [[CrossRef](#)]
38. Cristóbal, I.; Caramés, C.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Torrejón, B.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40169–40180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clarck, G.M. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 9067–9072. [[CrossRef](#)]
40. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
41. Cho, K.B.; Cho, M.K.; Lee, W.Y.; Kang, K.W. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Lett.* **2010**, *293*, 230–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Agarwal, A.; MacKenzie, R.J.; Pippa, R.; Eide, C.A.; Oddo, J.; Tyner, J.; Sears, R.; Vitek, M.P.; Odero, M.D.; Christensen, D.J.; et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2092–2103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Farrell, A.S.; Allen-Petersen, B.; Daniel, C.J.; Wang, X.; Rodriguez, S.; Impey, S.; Oddo, J.; Vitek, M.P.; Lopez, C.; Christensen, D.J.; et al. Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* **2014**, *12*, 924–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cristobal, I.; Madoz-Gúrpide, J.; Manso, R.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J. Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: A brief review. *Curr. Med. Res. Opin.* **2016**, *32*, 1137–1141. [[CrossRef](#)]

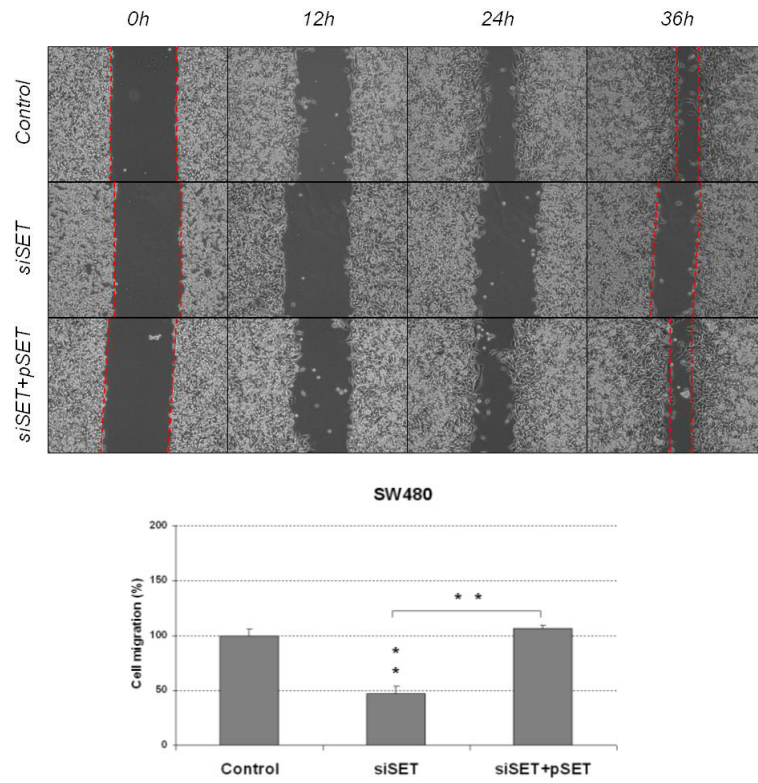


© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



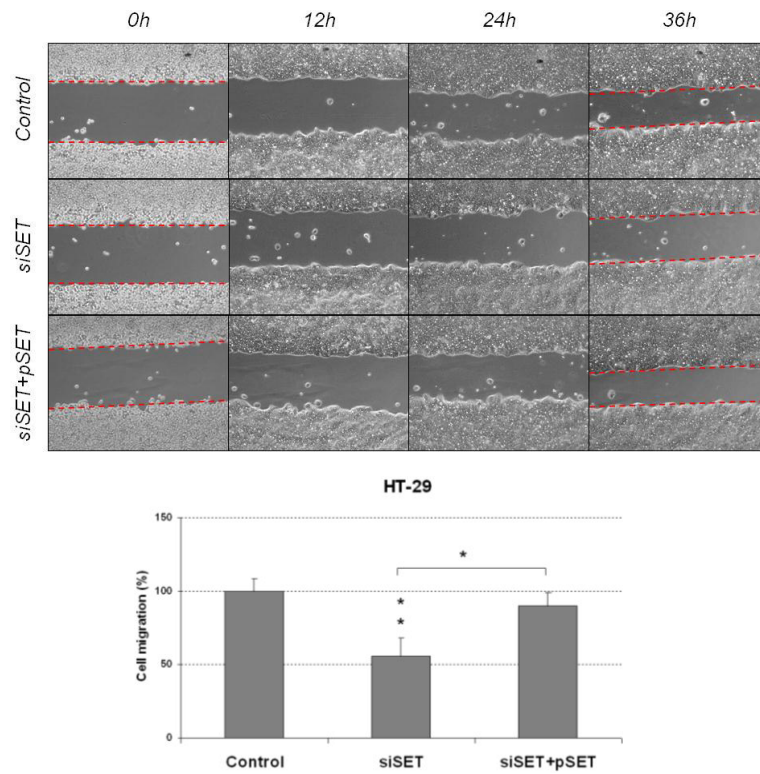
Supplementary Figure 1

Figure S1. SET modulates cell migration in CRC cells. Wound- healing assay showing migration in HT-29 cells after ectopic (A) SET silencing or (B) SET overexpression. Dashed lines represent the migration border; OE: overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



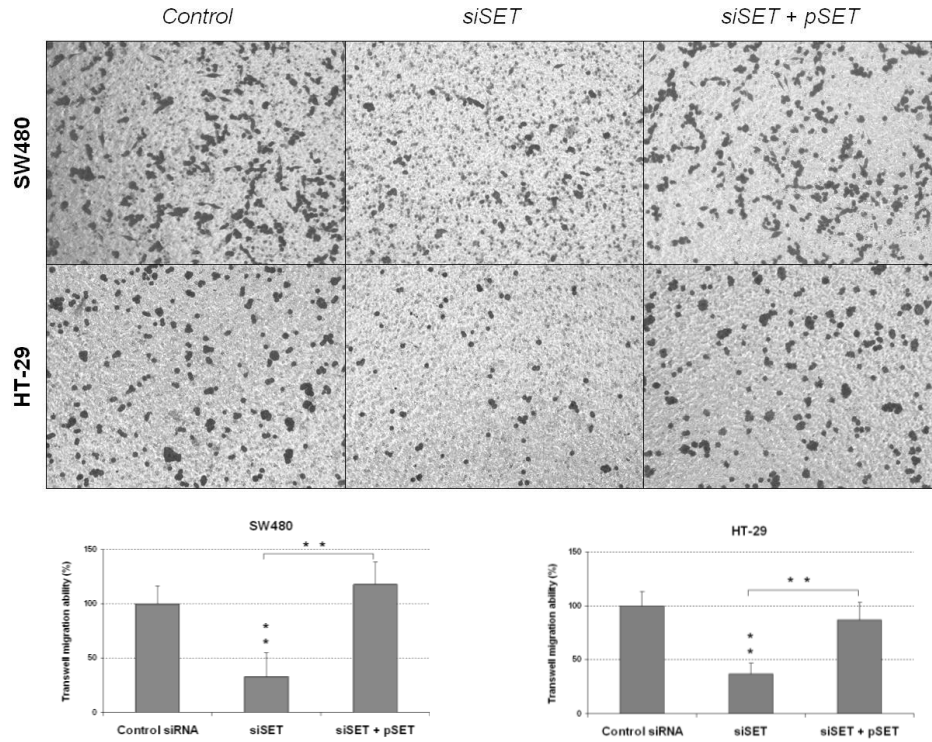
Supplementary Figure 2

Figure S2. Time-course analysis of a wound healing assay in SW480 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression. Dashed lines represent the migration border; OE: overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



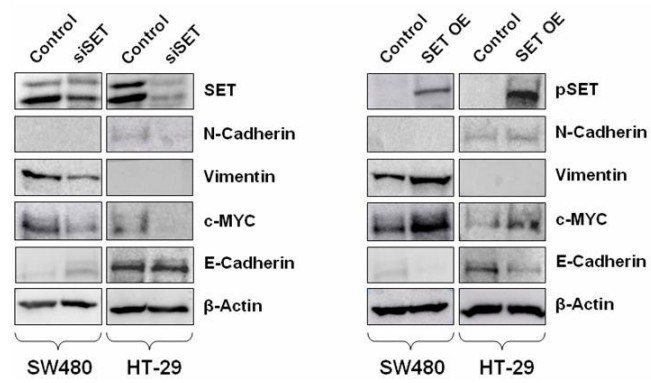
Supplementary Figure 3

Figure S3. Time-course analysis of a wound healing assay in HT-29 cells with SET silenced and with or without ectopic SET expression. Dashed lines represent the migration border; OE: overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



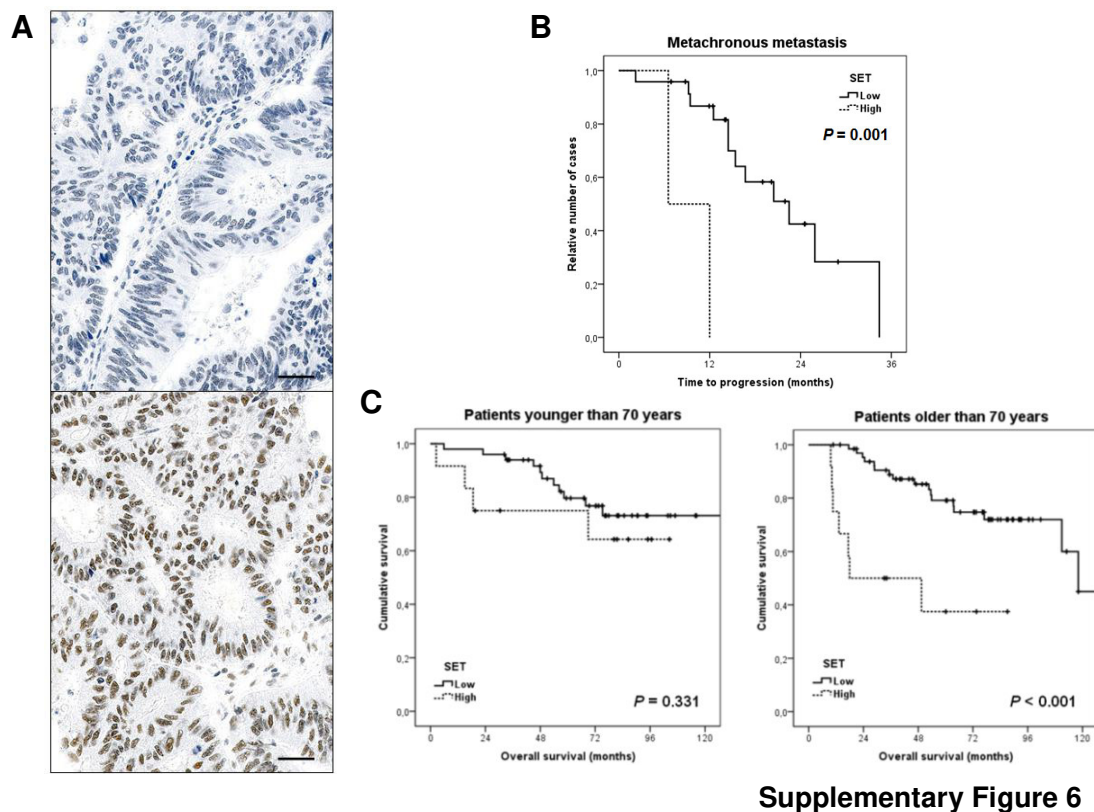
Supplementary Figure 4

Figure S4. Ectopic SET expression restores transwell migration in CRC cells with SET silenced. Transwell migration assay in SW480 and HT-29 cells after SET silencing with or without SET overexpression; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



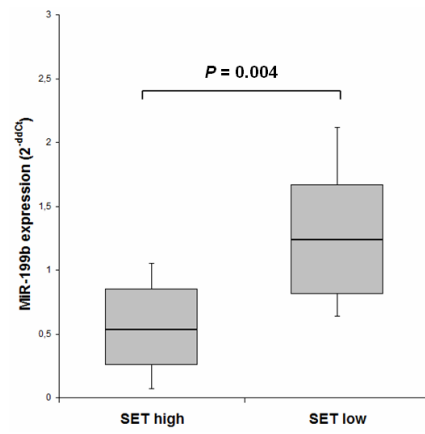
Supplementary Figure 5

Figure S5. SET modulates the expression of c-MYC and EMT proteins.



Supplementary Figure 6

Figure S6. (A) Immunohistochemical detection of SET expression in patients with early-stage CRC showing SET-negative and -positive stainings. The line shows 25 μ m. Original magnification x400. (B) Time to progression from metastatic diagnosis in the subgroup of patients with metachronous metastases (C) Kaplan-Meier analyses of OS in the subgroups of patients younger ($N = 62$) and older than 70 years ($N = 79$).



Supplementary Figure 7

Figure S7. Box-plot showing miR-199b expression levels in patients with ($N = 7$) and without ($N = 22$) SET overexpression.

Table S1. Clinical and molecular characteristics of a series of 231 CRC patients without metastatic disease at diagnosis.

		No. (%)
Sex		
	Male	155 (62.8)
	Female	92 (37.2)
Age		
	<70	86 (36.4)
	≥70	150 (62.8)
ECOG		
	0-1	205 (91.9)
	2-3	18 (8.1)
T		
	1	7 (2.8)
	2	48 (19.4)
	3	155 (62.7)
	4	29 (11.8)
	x	8 (3.3)
N		
	0	117 (47.4)
	1	67 (27.1)
	2	44 (17.8)
	x	19 (7.7)
Stage		
	I	39 (15.8)
	II	78 (31.6)
	III	130 (52.6)
Site of primary tumor		
	Colon	165 (68.5)
	Rectum	76 (31.5)
Progression (local or distant)		
	No	156 (63.2)
	Yes	91 (36.8)

Table S2. Association of ECOG status with age and stage parameters.

ECOG	No. Cases	No. ECOG 0-1 (%)	No. ECOG 2-3 (%)	<i>p</i>
Age	223	205	18	0.060
<70	83	80 (81.9)	3 (18.1)	
>70	140	125 (87.1)	15 (12.9)	
Stage	223	205	18	0.014
I-II	99	96 (89)	3 (11)	
III	124	109 (82.3)	15 (17.7)	

Table S3. Univariate and multivariate Cox analyses in the subgroup of elderly patients with early-stage CRC (N= 81).

	Univariate OS analysis				Multivariate OS Cox analysis			
	HR	95% CI		Significance	HR	95% CI		Significance
Stage				0.041				0.173
II	1.000				1.000			
III	3.068	1.046 to 8.998			2.158	0.714 to 6.524		
ECOG				0.001				0.004
0-1	1.000				1.000			
2-3	2.477	1.474 to 4.162			2.223	1.294 to 3.819		
T				0.470				-
1-2	1.000							
>2	1.292	0.644 to 2.593			-	-		
N				0.165				-
0-1	1.000							
2-x	1.307	0.896 to 1.908			-	-		
SET				0.001				0.007
No	1.000				1.000			
Yes	4.924	1.984 to 12.223			3.677	1.438 to 9.400		

OS: overall survival; CI: confidence interval, HR: hazard ratio.

Table S4. Clinical and molecular characteristics of the subgroup of 29 cases with both SET and miR-199b data.

		No. (%)	
Sex			
	Male	21	(72.4)
	Female	8	(27.6)
Age			
	<70	10	(38.5)
	≥70	16	(61.5)
T			
	1	0	(0)
	2	6	(20.7)
	3	17	(58.6)
	4	5	(17.2)
	x	1	(3.5)
N			
	0	10	(34.5)
	1	11	(37.9)
	2	7	(24.1)
	x	1	(3.5)
Stage			
	I-II	10	(34.4)
	III	19	(65.6)
Site of primary tumor			
	Colon	20	(69)
	Rectum	9	(31)
SET			
	Low	22	(75.9)
	High	7	(24.1)

Table S5. Statistical correlation between SET overexpression and miR-199b downregulation in 29 early-stage CRC.

		SET		<i>p</i>
	Total	Low (%)	High (%)	
MiR-199b	29	22	7	0.010
Low	4	1 (25)	3 (75)	
High	25	21 (84)	4 (16)	

DISCUSIÓN GENERAL

La baja regulación del microRNA-199b predice un pronóstico desfavorable y emerge como una nueva diana terapéutica

Los microRNAs son RNAs no codificantes de pequeño tamaño (entre 19 y 25 nucleótidos) cuya función está relacionada con la regulación de la expresión génica. Los miRs se unen a secuencias específicas de regiones 3'UTR del RNA mensajero diana y reprimen su traducción en función de la complementariedad entre el miR y el RNA mensajero. Por lo tanto, pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumores en función del gen cuya traducción se esté inhibiendo.

Una vez demostrada que la sobreexpresión de SET es un mecanismo que contribuye a la inhibición de PP2A en CCR, hemos querido investigar cómo se produce su desregulación en esta enfermedad. Para ello, hemos analizado si la expresión del miR-199b podría estar involucrada en dicha desregulación ya que este miR ha sido previamente descrito en otros modelos tumorales como LMA y coriocarcinoma como un regulador negativo de SET (Favreau *et al.*, 2016, Chao *et al.*, 2010). Cuantificamos los niveles de expresión del miR-199b en 5 líneas celulares en las que previamente se había descrito la sobreexpresión de SET (Cristóbal *et al.*, 2014), observando una baja expresión del miR en 4 de las 5 líneas estudiadas. Estos resultados, junto con su baja expresión en el subgrupo de pacientes de CCR con sobreexpresión de SET, sugieren que el miR-199b estaría jugando un importante papel en la inhibición de PP2A mediada por SET en esta enfermedad, lo cual se confirmó al observar una disminución de los niveles de SET junto con una activación de PP2A tras la expresión ectópica del miR en líneas celulares de CCR. Cabe destacar que la transfección con anti-miR-199b solo produce una leve disminución en la actividad PP2A debido, probablemente, a la baja expresión basal del miR y a la alta expresión de SET en las líneas celulares SW480 y HT29. Además, los efectos antitumorales del miR-199b sobre crecimiento celular pueden ser debidos a su papel como regulador negativo de SET, ya que la co-expresión del miR junto con SET restablece, casi completamente, la capacidad de proliferación de las células de CCR. Debido a esto, el miR-199b emerge como un nuevo supresor tumoral en CCR y su baja expresión es una alteración común que contribuye a la inhibición de PP2A en esta enfermedad. Sin embargo, el hecho de no reestablecerse de manera completa los niveles de proliferación también sugiere que otras dianas del miR-199b estarían jugando también un papel en este sentido, lo cual queda abierto a su confirmación en posteriores estudios que aclaren las vías de señalización y dianas del miR-199b y su función en CCR.

Por otro lado, se ha descrito al miR-199b involucrado en la resistencia adquirida a diferentes terapias antitumorales, como a imatinib en LMC (Joshi *et al.*, 2014), a cisplatino

en cáncer de ovario (Liu *et al.*, 2014) o a trastuzumab en cáncer de mama (Fang *et al.*, 2013). Por ello, hemos estudiado si el miR-199b podría afectar a la sensibilidad de los tratamientos convencionales de CCR y hemos observado que, efectivamente, el miR resensibiliza a las células colorrectales a los tratamientos con LOHP y 5-FU. Estos resultados concuerdan con el hecho de que el miR-199b regula negativamente a SET, el cual se ha descrito que modula la resistencia a LOHP y 5-FU en CCR (Cristóbal *et al.*, 2015), por lo que probablemente este efecto del miR-199b se produzca via SET.

A pesar de que algunos datos de la literatura describen al miR-199b como un supresor tumoral en cáncer humano (Cristóbal *et al.*, 2012; Garzia *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017; Koshizuka *et al.*, 2017), no se sabe nada sobre la función que ejerce en CCR. Se ha descrito que el miR-199b tiene valor pronóstico en carcinoma hepatocelular y cáncer tiroideo papilar (Wang *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014). Además, considerando que el miR es un mecanismo molecular de la sobreexpresión de SET en aproximadamente la mitad de los pacientes con CCRm y que SET es un marcador de mal pronóstico en estos casos, hemos hipotetizado que la desregulación de dicho microRNA podría tener un impacto clínico en esta enfermedad. Cabe destacar que la baja expresión del miR-199b determina un beneficio clínico en aquellos casos tratados con quimioterapia basada en LOHP. Este hecho concuerda con nuestros resultados *in vitro* y refuerza nuestra hipótesis de que el miR-199b incrementa la sensibilidad a LOHP en células de CCR.

El estado mutacional de *KRAS* es un factor molecular clave para determinar si un paciente de CCR se puede beneficiar de las terapias basadas en cetuximab (Karapetis *et al.*, 2008). Por ello, hemos evaluado el impacto clínico del miR-199b estratificando nuestra cohorte según la presencia o no de mutaciones en *KRAS*. De esta manera hemos encontrado que la baja regulación del miR muestra un gran impacto pronóstico tanto en SG como en SLP en el subgrupo de pacientes con *KRAS* nativo. Estos hallazgos podrían tener una potencial relevancia terapéutica ya que se ha descrito que FTY720, droga que activa a PP2A a través del bloqueo de SET (Saddoughi *et al.*, 2013), resensibiliza a las células de CCR a los tratamientos con cetuximab (Rosa *et al.*, 2013).

Se ha detallado anteriormente que, además de SET, el miR-199b regula importantes dianas como HES1, HIF1 α o HER2 en meduloblastoma, carcinoma hepatocelular y cáncer de mama, respectivamente (Garzia *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2013). Entre aquellos pacientes de CCRm que no presentaban sobreexpresión de SET se observó una baja expresión del microRNA en 7 de los 65 casos, lo cual podría sugerir la participación del miR-199b en la regulación de otras dianas distintas a SET en CCR. Además, hemos observado que la desregulación del miR-199b determina una menor SG en ese subgrupo de pacientes sin sobreexpresión de SET (mediana SG, 11 vs 31.5 meses, $p = 0.052$), aunque no

llega a alcanzarse la significancia debido, probablemente, al bajo número de casos estudiados. Por lo tanto, estas observaciones podrían indicar que el miR-199b tiene un potencial valor pronóstico independiente de SET, aunque habría que confirmarlo en estudios posteriores. Asimismo, los análisis multivariantes demostraron que la baja regulación del miR es un factor desfavorable independiente asociado con SG y SLP en CCRm, lo que confirma su valor pronóstico en esta enfermedad.

Garzia y sus colaboradores sugirieron en su trabajo que la desregulación del miR-199b en células metastásicas de meduloblastoma podría ser debido a la regulación epigenética basada en metilación que sufre este miR. Por lo tanto, es necesario evaluar en futuras investigaciones si se dan mecanismos similares de regulación transcripcional en las células de CCR. Por otra parte, la vía de señalización de Notch juega un papel relevante en los procesos de auto-renovación celular y se ha descrito que su inhibición disminuye el número de células tumorales CD133+ (Garzia *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2006). Además, cabe destacar que la regulación descrita entre el miR-199b y HES1, un efector de Notch, altera la subpoblación de células tumorales CD133+, lo que sugiere que dicho miR regula de manera indirecta a esta proteína (Garzia *et al.*, 2009; Andolfo *et al.*, 2012). Curiosamente, nosotros hemos demostrado que el miR-199b presenta una baja expresión después de la generación de colonosferas, las cuales presentan una mayor expresión de CD133. Asimismo, hemos analizado el CD133 en 64 pacientes de CCRm y hemos observado una correlación negativa entre el miR-199b y CD133, lo cual podría indicar una potencial relación entre ambos.

En resumen, nuestros resultados muestran que la desregulación del miR-199b es una alteración frecuente en CCRm que emerge como una nueva diana terapéutica y como un nuevo mecanismo que contribuye a la sobreexpresión de SET en esta enfermedad. Además, los hallazgos realizados indican que esta alteración tiene un valor pronóstico independiente ya que permite predecir resultados desfavorables en pacientes de CCRm y podría tener importantes implicaciones terapéuticas en esta enfermedad puesto que sensibiliza las células de CCR a los tratamientos con 5-FU y LOHP.

La desregulación de SETBP1 surge como un posible mecanismo que contribuye a la inhibición de PP2A en CCR.

SETBP1 es una oncoproteína, predominantemente nuclear, que protege a SET de su degradación en el proteosoma permitiendo la formación del heterodímero SETBP1-SET. Este heterodímero interacciona con PP2A formando el complejo SETBP1-SET-PP2A que resulta en la inactivación de PP2A. SETBP1 se ha descrito sobreexpresado en LMA,

incrementando de esta manera la cantidad de SET y resultando finalmente en la inactivación de PP2A (Cristóbal *et al.*, 2010).

La baja expresión del miR-199b ha sido identificada como una alteración responsable de la desregulación de SET en, aproximadamente, la mitad de los pacientes de CCR que presentan sobreexpresión de esta proteína. Sin embargo, la existencia de otros casos que muestran una alta expresión de SET a pesar de no presentar una desregulación del miR-199b nos ha llevado a investigar la existencia de mecanismos adicionales que produzcan la desregulación de SET en esta enfermedad. Por ello, hemos investigado por primera vez el estado de SETBP1 como un nuevo posible mecanismo de desregulación de SET en CCR. De acuerdo con los resultados previamente descritos en LMA (Cristóbal *et al.*, 2010), hemos encontrado una alta expresión de SETBP1 en 5 de las 10 líneas celulares analizadas. Sin embargo, solo 2 de los 14 pacientes estudiados mostraron una sobreexpresión de SETBP1 en tejido tumoral cuando lo comparamos con su tejido pareado normal, lo cual indica que la alta expresión de SETBP1 parece ser una alteración poco prevalente en esta enfermedad. Por otro lado, hemos demostrado mediante co-inmunoprecipitación que se forma el complejo inhibitorio SETBP1-SET-PP2A, lo cual indica que SETBP1 estaría ejerciendo una inhibición de PP2A via SET en CCR. El bajo número de pacientes con alta expresión de SETBP1 nos llevó a pensar que podrían existir mecanismos alternativos a su sobreexpresión, como las mutaciones de ganancia de función previamente descritas Glu858Lys, Asp868Asn/Tyr, Ser869Gly/Asn, Gly870Ser, Ile871Thr y Asp880Glu/Asn (Makishima *et al.*, 2013; Piazza *et al.*, 2013; Thol *et al.*, 2013). Por ello, se analizó el estado mutacional de *SETBP1* en 55 pacientes de CCR en los que previamente se estudiaron los niveles de expresión de SET y p-PP2A.

Curiosamente, Piazza y sus colaboradores determinaron en su trabajo que las mutaciones en *SETBP1* conducen al aumento de la expresión de la proteína. Los aminoácidos 860-880 incluyen una región crítica para la unión de la ubiquitina y posterior degradación de la proteína. Los autores demuestran que la alteración Gly870Ser impide la unión de la ubiquitina ligasa E3, lo que produce diferencias en cuanto a la estabilidad de la proteína SETBP1. De hecho, las células que expresan la mutación Gly870Ser muestran mayores niveles de SETBP1 así como una mayor expresión de p-PP2A (Y307) e inhibición de la fosfatasa. Además, los autores analizan la frecuencia de las mutaciones en *SETBP1* en 644 muestras de pacientes de leucemia, observando que alrededor del 25% de los casos presentaban dichas mutaciones. También demostraron que el 92% de las mutaciones detectadas estaban localizadas en una pequeña región de 14 residuos, desde Glu858 hasta Ile871. Sin embargo, no detectaron ninguna mutación cuando analizaron un amplio panel de líneas celulares de CCR (Piazza *et al.*, 2013). Esta observación concuerda con nuestros

resultados y refuerza aún más el hecho de que las mutaciones en *SETBP1* no son frecuentes en CCR. Asimismo, Makishima y colaboradores identificaron en su estudio mutaciones en *SETBP1* en la misma región descrita por Piazza, identificando Asp868Asn, Gly870Ser y Ile871Thr como las mutaciones más frecuentes (Makishima *et al.*, 2013).

En nuestro trabajo hemos analizado en una cohorte de pacientes con CCRm el estado mutacional de *SETBP1* en los codones 858-880 y no hemos detectado ninguna mutación en muestras de pacientes, lo que sugiere que estas alteraciones son, si existen, de muy baja prevalencia en esta enfermedad. Sin embargo, el pequeño número de muestras analizadas no nos permite excluir la existencia de mutaciones en pacientes con esta enfermedad y representa una limitación de nuestro estudio. Por lo tanto, es necesario validar estos resultados en una cohorte de mayor tamaño. Además, sería muy interesante confirmar estos resultados en un subgrupo de pacientes con CCR y sobreexpresión de SET, ya que en este subgrupo cabría esperar un mayor número de mutaciones en *SETBP1*. De manera adicional, también podría analizarse en nuestra cohorte si se producen variaciones en el número de copias de la región cromosómica 18q12 con el fin de identificar si se producen alteraciones genómicas que afecten al gen *SETBP1*. De hecho las alteraciones cromosómicas que conducen a la desregulación de *SETBP1* sólo han sido evaluadas en un caso que mostraba un reordenamiento cromosómico (Cristóbal *et al.*, 2010).

En conclusión, nuestros resultados indican que *SETBP1* es funcionalmente activo en CCR a través de la formación del complejo *SETBP1*-SET-PP2A. Además, la sobreexpresión de *SETBP1* emerge como un nuevo mecanismo que contribuye a la desregulación de SET y a la inactivación de PP2A en algunos casos de CCR. Sin embargo, las mutaciones que afectan a esta proteína no son eventos relevantes en CCRm. Así, la relevancia biológica de *SETBP1* en este tipo de cáncer, junto con su implicación clínica debería ser investigada en posteriores estudios.

Baja expresión de Caveolina-1 en pacientes con CCR localizado

Caveolina-1, proteína estructural principal de las caveolas, está frecuentemente desregulada en cáncer humano. Se ha descrito que esta proteína muestra propiedades de supresor tumoral o de oncogén en función del tipo celular y del estadio de la enfermedad. Por ejemplo, Kannan y sus colaboradores muestran en su trabajo que CAV-1 promueve la progresión del cáncer gástrico a través de la regulación de la TEM bajo condiciones de hipoxia (Kannan *et al.*, 2014). De acuerdo con esto, se ha observado que la sobreexpresión de caveolina-1 promueve la migración e invasión celular en carcinoma renal de células claras (Ruan *et al.*, 2017). Sin embargo, en otro estudio se mostró que la sobreexpresión de CAV-1 inhibe la proliferación e invasión celular en carcinoma pancreático (Han *et al.*, 2009).

Asimismo, Wiechen y sus ayudantes observan en su trabajo que existe una baja expresión de CAV-1 en carcinoma de ovario en estadio avanzado y sugieren que esta proteína podría actuar como supresor tumoral en esta enfermedad (Wiechen *et al.*, 2001).

Estudios previos han propuesto que CAV-1 sufre un cambio de función durante la progresión del CCR, ya que inicialmente actúa como supresor tumoral en estadios tempranos pero, al progresar a estadios más avanzados, su función cambia y CAV-1 actúa como oncogén. Sin embargo, se ha descrito la existencia de niveles de CAV-1 muy variables en tumores primarios de CCR, en donde se observan niveles disminuidos de dicha proteína en el 45% de los casos en estadio I-II y en el 11% de los casos en estadio III (Ha *et al.*, 2012). Estos hallazgos no concuerdan con nuestras observaciones, ya que en nuestro trabajo hemos detectado una prevalencia mucho mayor de la baja expresión de CAV-1. No obstante, esta diferencia encontrada respecto al trabajo de Ha puede ser explicada por el hecho de que los autores cuantifican los niveles de CAV-1 mediante PCR a tiempo real y en algunos casos los niveles de ARN mensajero y de proteína podrían no correlacionar, tal y como nosotros hemos observado en nuestro estudio. Por tanto, nuestros resultados indican que CAV-1 debería ser estudiada a nivel de proteína y que las conclusiones obtenidas a partir de los estudios de PCR a tiempo real deben tomarse con cautela. Además, las discrepancias observadas en aquellos trabajos que utilizan inmunohistoquímica pueden deberse a la especificidad del anticuerpo empleado.

Por otro lado, se ha descrito en anteriores trabajos que se produce una metilación aberrante de CAV-1 en estadios precancerosos, lo cual podría estar relacionado con su silenciamiento durante la progresión del CCR (Lin *et al.*, 2004). Se ha confirmado la metilación en el promotor de CAV-1, pero también que la proteína podía ser reactivada a través de hiperacetilación de histonas (Dasgupta *et al.*, 2015). Estos descubrimientos podrían representar un mecanismo epigenético molecular clave en la inhibición de CAV-1 en estadios tempranos del CCR y en la posterior reactivación de ésta en estadios más avanzados de la enfermedad. Sin embargo, estos hallazgos no pueden explicar la falta de correlación observada en pacientes que muestran una gran baja regulación de CAV-1 y unos altos niveles de ARNm. Debido a esto, hemos investigado la posibilidad de que se esté produciendo una regulación dependiente de miRs, como un mecanismo post-transcripcional adicional a la metilación, en pacientes con CCR. Para ello, hemos analizado los perfiles de expresión del miR-124, miR-133a y miR-802, ya que han sido previamente descritos como reguladores de CAV-1 (Nohata *et al.*, 2011; Butz *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2011), en aquellos casos en los que existía una falta de correlación entre los niveles proteicos y los de ARNm de CAV-1. Curiosamente, hemos identificado la sobreexpresión del miR-124 como un potencial mecanismo que contribuye a la desregulación de CAV-1 en

pacientes de CCR. Sin embargo, en dos de los casos no hemos encontrado desregulado ninguno de los miRs estudiados, lo cual indica que deben de estar produciéndose otros mecanismos adicionales que controlan a CAV-1 a nivel post-transcripcional y que deberán ser identificados en estudios posteriores.

En conclusión, nuestros resultados muestran una expresión reducida de CAV-1 en pacientes con CCR localizado. La falta de correlación encontrada entre los niveles de expresión de proteínas y ARNm en un subgrupo de casos de CCR podría servir para explicar algunas de las discrepancias encontradas en la literatura. Además, nuestras observaciones podrían indicar la existencia de una regulación dependiente de microRNA en CCR. Sin embargo, son necesarios futuros trabajos en los que se estudien los mecanismos moleculares que gobiernan el estado de CAV-1 durante la progresión de la enfermedad.

La desregulación de SET es un evento asociado a progresión tumoral que predice pronóstico adverso en pacientes con cáncer colorrectal localizado

PP2A es un supresor tumoral que regula un gran número de rutas de señalización. Se ha descrito anteriormente que esta fosfatasa está frecuentemente inactivada en cáncer (Westermarck *et al.*, 2008; Eichhorn *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que las células transformadas emplean diferentes mecanismos para inhibir PP2A, incluyendo alteraciones en alguna de sus subunidades, como la disminución de la expresión o la fosforilación sobre un residuo de tirosina (Y307) en la subunidad catalítica (Cristóbal *et al.*, 2014), y también mediante la sobreexpresión de inhibidores endógenos como SET y CIP2A (Junttila *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015).

SET (I2PP2A/TAF-I β) es una oncoproteína multifuncional de 39 kDa involucrada en un gran número de procesos celulares. Esta proteína se expresa de manera ubicua en muchos tipos de tejido humano (Nagata *et al.*, 1998). SET es un potente inhibidor endógeno de PP2A cuya sobreexpresión ha sido descrita en varios tipos tumorales (Huang *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015). Además, esta proteína está emergiendo como una prometedora diana molecular sobre la que desarrollar nuevas estrategias terapéuticas alternativas (Sirma *et al.*, 2012; Leopoldino *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2016; Switzer *et al.*, 2011).

Nuestros estudios previos muestran que la inhibición de PP2A es un evento frecuente en CCR y hemos identificado la desregulación de SET como un mecanismo clave para inhibir dicha fosfatasa (Cristóbal *et al.*, 2014). Además, hemos observado que SET promueve proliferación celular y formación de colonosferas, impidiendo así la actividad antitumoral de PP2A y modulando la sensibilidad de las células de CCR a los tratamientos

basados en LOHP. A nivel clínico, hemos demostrado que la sobreexpresión de SET es una alteración recurrente que predice mal pronóstico e induce una disminución en la sensibilidad a LOHP en CCRm (Cristóbal *et al.*, 2015), sin embargo, su significado clínico en CCR localizado es desconocido. Todo esto nos permite hipotetizar que SET podría estar jugando un papel importante en la progresión del CCR, regulando las capacidades de migración e invasión celular y teniendo un impacto clínico en estadíos tempranos de esta enfermedad.

Se ha descrito en anteriores trabajos que Rac-1 controla migración celular y que esta proteína se asocia con SET (Evers *et al.*, 2000). Tras la activación de Rac-1 en el citosol, SET se transloca hasta la membrana plasmática y forma enlace con Rac-1, cooperando para inducir movilidad celular (ten Klooster *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que SET forma complejos con NM23-H1, supresor tumoral de metástasis, inhibiendo su actividad (Fan *et al.*, 2003). Estos hechos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en el que estudiamos la importancia de la desregulación de SET en la progresión del CCR. Para ello, se moduló ectópicamente la expresión de la proteína en dos líneas celulares distintas, observando que el silenciamiento de SET conducía a una disminución en la capacidad de migración y TEM y que, por el contrario, la sobreexpresión de SET producía un incremento en ambas capacidades. A pesar de que los resultados obtenidos indican que la desregulación de SET juega un papel importante en la progresión del CCR, sería interesante llevar a cabo más experimentos para elucidar si, efectivamente, estos resultados son objeto de la cooperación de SET con Rac-1 promoviendo migración, y aclarar la relevancia de la regulación de SET sobre c-MYC, proteína implicada en agresividad y progresión a enfermedad metastásica (Cho *et al.*, 2010).

Para investigar más a fondo la importancia de la desregulación de SET, hemos evaluado la expresión de esta proteína en una cohorte de 231 casos de CCR localizado sin enfermedad metastásica al diagnóstico. Curiosamente, hemos encontrado que la sobreexpresión de SET tiene una menor prevalencia en esta cohorte (13.8%) que la previamente encontrada en CCRm (24.8%) (Cristóbal *et al.*, 2015). En consonancia con esto, se observó que la sobreexpresión de SET se asociaba con un peor estado general según la escala ECOG. Sin embargo, esta alteración se asoció de manera significativa con aquellos casos que presentaban tumores de colon (31.8% vs 11.8%), mientras que en este trabajo hemos observado una mayor frecuencia de esta alteración en el subgrupo de pacientes con tumores rectales (14.6% vs 16.2%). Por lo tanto, la prevalencia de esta alteración permanece sin cambios significativos en los tumores rectales, pero parece aumentar progresivamente su prevalencia durante la progresión de los pacientes con tumores de colon. Por otra parte, la causa por la cual la sobreexpresión de SET solo se asocia con

recaída en aquellos casos en estadio II podría ser debido al hecho de que el estadio III incluye pacientes con una enfermedad más avanzada en la que la presencia de esta alteración podría ser menos relevante para la determinación de recaídas debido a alteraciones adicionales no presentes en aquellos casos con estadio II. Además, la sobreexpresión de SET se asocia de manera significativa con un menor tiempo a metástasis y menor tiempo a la progresión en el subgrupo de pacientes que desarrollan recidiva distante, lo cual sugiere que esta alteración podría estar determinando una enfermedad más agresiva. Nuestros resultados también muestran que la sobreexpresión de SET predice una menor SG y que el impacto pronóstico es especialmente significativo en el subgrupo de pacientes mayores de 70 años. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de SET predice mal pronóstico en el subgrupo de pacientes de edad avanzada y que aquellos pacientes que presentan esta alteración podrían beneficiarse del uso de terapias dirigidas contra SET, como el empleo del activador de PP2A FTY720, el cual al estar aprobado por la FDA permite llevar a cabo un seguimiento más rápido de su eficacia, o antagonistas específicos de SET (Switzer *et al.*, 2011; Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2016; D'Souza *et al.*, 2016; Hung *et al.*, 2017).

Al igual que en CCRm, en donde se evidenció que el miR-199b presentaba una baja expresión en aproximadamente el 50% de los casos que sobreexpresaban SET, en este trabajo hemos evaluado si dicho microRNA contribuye a la desregulación de SET en CCR localizado. Para ello, hemos analizado los niveles de expresión del miR-199b en 29 pacientes de nuestra cohorte con suficiente material disponible, observando que 7 de ellos presentaban sobreexpresión de SET y, de esos 7 casos, 4 mostraban una baja regulación del miR-199b. Además, hemos demostrado que la baja expresión del miR-199b se asocia de manera significativa con la sobreexpresión de SET, ya que se observó que los niveles totales del miR se correlacionaban inversamente con los de SET en nuestra cohorte. Sin embargo, el hecho de que haya casos con sobreexpresión de SET que no presenten una baja regulación del miR-199b nos ha llevado a pensar que deben existir mecanismos moleculares alternativos que contribuyan a la desregulación de SET del mismo modo que anteriormente habíamos observado en el subgrupo de pacientes con CCR y enfermedad metastásica.

Curiosamente, nuestros resultados demuestran que SET juega un papel clave en la progresión del CCR potenciando tanto la migración celular como crecimiento en independencia de anclaje y TEM. Además, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con el papel previamente descrito de SET en migración (ten Klooster *et al.*, 2007), por lo que la importancia de Rac-1 en la migración de las células de CCR mediada por SET debería analizarse en estudios posteriores. Por otro lado, mostramos el potencial

impacto de SET como una nueva diana molecular en CCR. En este sentido, el uso de antagonistas de SET, como OP449 y FTY720, han surgido en los últimos años como nuevos enfoques terapéuticos en tumores con sobreexpresión de esta proteína, pudiendo ser útiles también en pacientes con CCR localizado. OP449 es un péptido específico que ha demostrado tener propiedades antitumorales en leucemia, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer gástrico (Enjoji *et al.*, 2018; Shlomai *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2014; Farrell *et al.*, 2014), pero su potencial utilidad en CCR aún debe ser evaluada. FTY720 es un inmunosupresor actualmente usado en esclerosis múltiple que ha demostrado tener efectos antitumorales en diversos cánceres, incluyendo el CCR (Cristóbal *et al.*, 2016).

En resumen, hemos demostrado en este trabajo que la sobreexpresión de SET contribuye a la progresión del CCR potenciando las capacidades de migración y TEM. Además, dicha sobreexpresión predice mal pronóstico principalmente en pacientes mayores de 70 años. Asimismo, hemos identificado la baja regulación del miR-199b como un mecanismo molecular involucrado en la desregulación de SET en un gran número de casos que presentan sobreexpresión de la proteína. Por último, nuestros resultados ponen de manifiesto que SET podría servir para predecir recaídas en pacientes de CCR en estadio II y definir un subgrupo de pacientes de CCR localizado que podrían beneficiarse del uso de antagonistas de SET o activadores de PP2A en los protocolos clínicos.

Valoración global de los resultados obtenidos

El trabajo de investigación llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral ha permitido estudiar en mayor profundidad los mecanismos moleculares que producen la desregulación de la proteína SET así como su impacto clínico en CCR. SET actúa como un potente inhibidor endógeno de la proteína fosfatasa PP2A, un supresor tumoral que se ha descrito inactivado en numerosos tipos de cáncer. Así, la identificación de los mecanismos moleculares que contribuyen a la sobreexpresión de SET nos permite aumentar nuestra comprensión sobre las vías de señalización que desregulan PP2A de cara a su empleo como diana molecular para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, en este caso en pacientes con CCR. Además, en el presente trabajo se han identificado nuevos marcadores con impacto clínico, permitiendo definir subgrupos de pacientes con mal pronóstico y mayor probabilidad de recidiva debido a que son alteraciones que a su vez modulan la sensibilidad de las células de CCR a los tratamientos estándar actuales.

Esta tesis doctoral surgió como consecuencia de los resultados previos obtenidos en el trabajo de Cristóbal y colaboradores, en donde se demostró que la desregulación de PP2A era un evento común en CCR (Cristóbal *et al.*, 2014). A raíz de este trabajo se decidió profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que producían dicha

desregulación, observándose que SET está sobreexpresado en un gran porcentaje de casos con CCRm (Cristóbal *et al.*, 2015). En este punto ya se habían identificado varias estrategias empleadas por las células tumorales para inhibir PP2A, pero faltaba identificar cuáles eran los mecanismos moleculares que producían la desregulación de su principal inhibidor endógeno (SET) y su potencial impacto clínico en CCR localizado.

En el desarrollo de esta tesis doctoral se ha pretendido abordar el estudio de la regulación de SET desde diferentes perspectivas como son la post-transcripcional con el miR-199b y la post-traducciona l vía SETBP1, permitiendo identificar los mecanismos moleculares involucrados en su desregulación y las principales rutas de señalización afectadas. Así, hemos demostrado que SET se encuentra regulado negativamente por el miR-199b y que la proteína de unión SETBP1 es funcionalmente activa en CCR impidiendo que SET sea degradada por proteasas. Además, Cristóbal y ayudantes ponen de manifiesto que la sobreexpresión de EVI-1 es un evento que contribuye a la desregulación de SET en leucemias (Cristóbal *et al.*, 2012), por lo que sería interesante comprobar su papel contribuyendo a la desregulación de SET así como su valor pronóstico o terapéutico en CCR. Por otro lado, SET participa en un gran número de rutas señalización y procesos celulares, regulando dianas con una gran relevancia en cáncer. Éste es el caso de la regulación indirecta ejercida sobre el supresor tumoral p53; Wei y colaboradores demuestran en su trabajo que SET regula a p-MDM2^{S166}, la cual a su vez regula negativamente a p53. Los autores observan que la inhibición de SET permite la activación de PP2A, reduciéndose los niveles de p-MDM2^{S166} y aumentando la estabilización de p53 (Wei *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha descrito una regulación indirecta de SET sobre el factor de transcripción heterodimérico AP-1, en donde la inhibición de PP2A por parte de la oncoproteína permite que aumenten los niveles de fosforilación de c-Jun sobre los residuos de Ser63 y Ser73, conduciendo de esta manera a un aumento de la expresión de AP-1 y de su actividad transcripcional sobre sus genes diana (Al-Murrani *et al.*, 1999). Anteriormente hemos mencionado que SET colabora con Rac-1 para inducir movilidad celular (ten Klooster *et al.*, 2007), pero, además, se ha demostrado que SET regula a Rac-1, contribuyendo de esta manera a la TEM (Mody *et al.*, 2017). Finalmente, cabe destacar el prometedor papel que CAV-1 parece estar desarrollando en cáncer, y es que se ha descrito que esta proteína estructural inhibe a PP2A a través de su unión directa con la subunidad catalítica de la fosfatasa, reduciendo así su actividad y conduciendo a un aumento en la fosforilación de sus sustratos específicos, que incluyen a Akt y ERK1/2 (Li *et al.*, 2003), los cuáles a su vez son también dianas de la acción de PP2A. Además, se ha descrito que CAV-1 promueve la activación de Rac-1, favoreciendo así la migración de células tumorales (Lobos-González *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha descrito que el miR-199b es capaz de

regular procesos de endocitosis a través de la regulación negativa que ejerce sobre CAV-1 (Aranda *et al.*, 2015), es capaz de regular a p53, formando un eje regulador que actúa sobre la célula madre cancerosa a través de c-Myc (Luanpitpong *et al.*, 2014), y la pérdida de expresión de CAV-1 aumenta la activación de AP-1 mediada por la citoqueratina K18 (Trimmer *et al.*, 2013). La Figura 10 resume los resultados obtenidos en esta tesis y el papel central de SET como regulador de las rutas de señalización anteriormente comentadas.

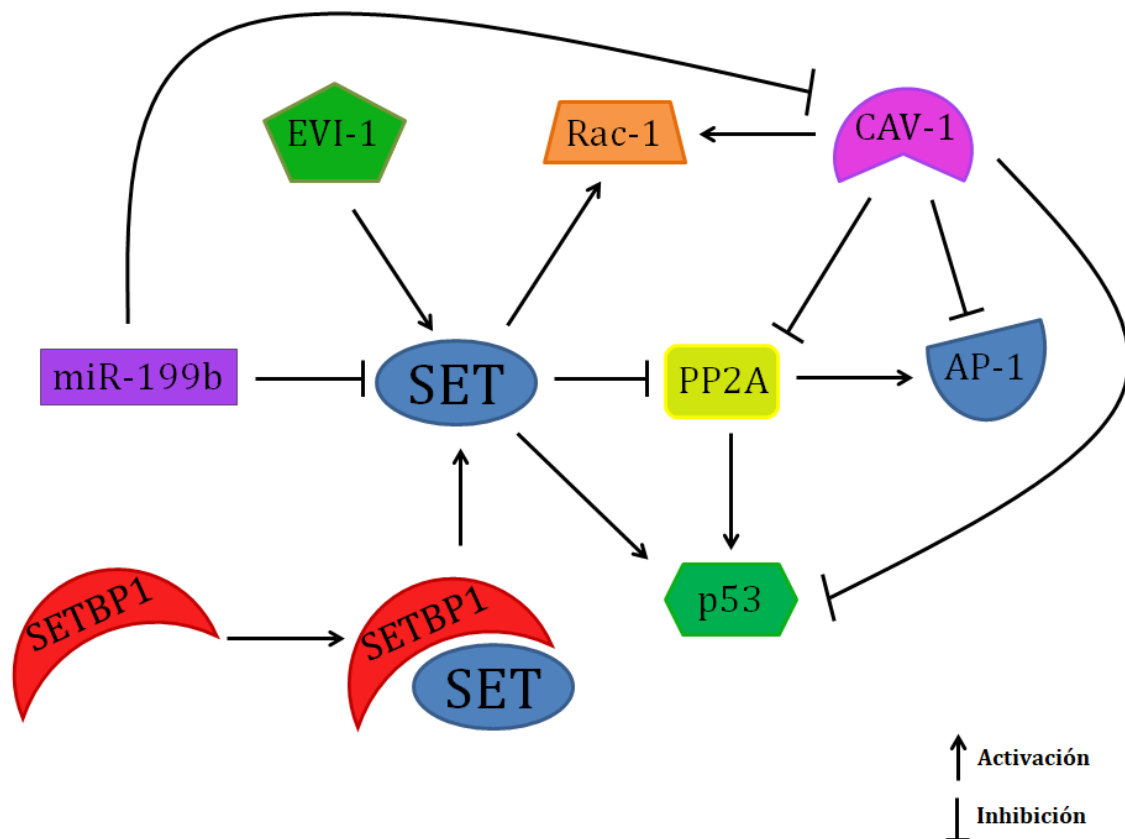


Figura 10. Modelo que incluye las rutas de señalización principales de SET y sus mecanismos de regulación endógena.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. La baja expresión del miR-199b es una alteración común en cáncer colorrectal que contribuye a la inhibición de PP2A mediada por SET. Asimismo, la expresión ectópica de este microRNA produce una disminución de la proliferación celular.
2. El miR-199b sensibiliza a las células de cáncer colorrectal a los tratamientos basados en oxaliplatino y 5-fluorouracilo a través de la regulación negativa que ejerce sobre SET, el cual ha sido previamente descrito como modulador de la resistencia adquirida a estos agentes quimioterápicos.
3. La baja expresión del miR-199b determina una menor supervivencia global y progresión libre de enfermedad en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Además, la desregulación de este microRNA afecta a la expresión de CD133, lo cual reafirma su papel como supresor tumoral.
4. SETBP1 es funcionalmente activo en cáncer colorrectal y ejerce su función a través de la formación del complejo heterotrimérico SETBP1-SET-PP2A que protege a SET de su degradación en el proteosoma, promoviendo así la inactivación de PP2A.
5. Las mutaciones de *SETBP1* descritas en otros tipos tumorales, de existir, son eventos muy poco frecuentes en cáncer colorrectal metastásico y, por lo tanto, no representan un mecanismo relevante para la desregulación de SET en esta enfermedad.
6. La baja expresión de CAV-1 es un evento común que sugiere un papel como supresor tumoral en estadíos tempranos del cáncer colorrectal. Además, hemos identificado la desregulación del miR-124 como una alteración que podría contribuir a su desregulación en esta enfermedad.
7. La sobreexpresión de SET es un evento común que contribuye a la progresión del cáncer colorrectal potenciando las capacidades de migración, crecimiento con independencia de anclaje y transición epitelio-mesénquima.
8. La alta expresión de SET predice una menor supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal localizado y se asocia de manera significativa con un menor tiempo a la metástasis en aquellos pacientes que desarrollan metástasis metacrónicas. Además, su valor pronóstico es particularmente significativo en pacientes mayores de 70 años.

BIBIOGRAFÍA

Adachi Y, Pavlakis GN, Copeland TD. Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem*. 1994; 269(3):2258-2262.

Agarwal A, MacKenzie RJ, Pippa R, et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(8):2092-2103.

Alshemmari SH, Rajan R, Emadi A. Molecular Pathogenesis and Clinical Significance of Driver Mutations in Primary Myelofibrosis: A Review. *Med Princ Pract*. 2016; 25(6):501-509.

Al-Murrani SW, Woodgett JR, Damuni Z. Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c-Jun and AP-1 activity. *Biochem J*. 1999; 341(Pt 2):293-298.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol*. 2008; 26(10):1626–1634.

American Cancer Society (2018). Colorectal Cancer Stages [online]. Available from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html> [21 Feb 2018].

Andolfo I, Liguori L, De Antonellis P, et al. The micro-RNA 199b-5p regulatory circuit involves Hes1, CD15, and epigenetic modifications in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2012; 14(5):596–612.

Aranda JF, Canfrán-Duque A, Goedeke L, et al. The miR-199-dynamin regulatory axis controls receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci*. 2015; 128(17):3197-3209.

Aschele C, Cionini L, Lonardi S, et al. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: Pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29(20):2773–2780.

Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, et al. Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res*. 2002; 62(5):1410-1419.

Bard-Chapeau E, Jeyakani J, Kok C, et al. Ecotopic viral integration site 1 (EVI1) regulates multiple cellular processes important for cancer and is a synergistic partner for FOS protein in invasive tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(6):2168–2173.

Barras D. *BRAF* Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark Cancer*. 2015; 7(Suppl 1):9-12.

Bayarkhangai B, Noureldin S, Yu L, et al. A comprehensive and perspective view of oncoprotein SET in cancer. *Cancer Med*. 2018; 7(7):3084-3094.

Bennouna J, Sastre J, Arnold D, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14(1):29-37.

Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, et al. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*. 1999; 10(5):585-594.

Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, et al. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*. 2001; 276(46):43285-43293.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27(5):663-671.

Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Ezym Res*. 2011; 2011:329098.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(8):394-424.

Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014; 383(9927):1490-1502.

Brinkmann V. FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol*. 2009; 158(5):1173-82.

Butz H, Szabo' PM, Khella HW, et al. miR-target network reveals miR-124 as a key miR contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behavior by targeting CAV1 and FLOT1. *Oncotarget*. 2015; 6(14):12543-12557.

Canela N, Rodríguez-Vilarrupla A, Estanyol JM, et al. The SET protein regulates G2/M transition by modulating Cyclin B-Cyclin-dependent Kinase 1 activity. *J Biol Chem*. 2003; 278(2):1158-1164.

- Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2015; 149(5):1177–1190.
- Carlson SG, Eng E, Kim EG, et al. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9(10):1873-1880.
- Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(6):1688–1694.
- Chae YC, Kim KB, Kang JY, et al. Inhibition of FoxO1 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-Ibeta induces p21 transcription. *FEBS Lett*. 2014; 588(17):2867-2873.
- Chang DZ, Kumar V, Ma Y, et al. Individualized therapies in colorectal cancer: KRAS as a marker for response to EGFR-targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2009; 2:18.
- Chao A, Tsai CL, Wei PC, et al. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett*. 2010; 291(1):99-107.
- Chen E, Xu X, Liu T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Cancer Syndromes: Recent Basic and Clinical Discoveries. *J Oncol*. 2018; 3979135.
- Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*. 1992; 257(5074):1261-1264.
- Cho KB, Cho MK, Lee WY, et al. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Lett*. 2010; 293(2):230–239.
- Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood*. 2011; 118(15):4150-4158.
- Cohen R, Cervera P, Svrcek M, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? *Curr Treat Options in Oncol*. 2017; 18(2):9.
- Cristóbal I, Blanco FJ, García-orti L, et al. SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010; 115(3):615-625.

Cristóbal I, Caramés C, Rincón R, et al. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(25):40169-40180.

Cristóbal I, Cirauqui C, Castello-Cros R, et al. Downregulation of PPP2R5E is a common event in acute myeloid leukemia that affects the oncogenic potential of leukemic cells. *Haematologica*. 2013; 98(9):e103-104.

Cristóbal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, et al. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012; 97(4):543-550.

Cristóbal I, González-Alonso P, Daoud L, et al. Activation of the Tumor Suppressor PP2A Emerges as a Potential Therapeutic Strategy for Treating Prostate Cancer. *Mar Drugs*. 2015; 13(6):3276-3286.

Cristóbal I, Madoz-Gúrpide J, Manso R, et al. Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: a brief review. *Curr Med Res Opin*. 2016; 32(6):1137-1141.

Cristóbal I, Manso R, Rincón R, et al. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol Cancer Ther*. 2014; 13(4):938-947.

Cristóbal I, Rincón R, Manso R, et al. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(9):1823-1829.

Cristóbal I, Rincón R, Manso R, et al. Deregulation of the PP2A Inhibitor SET Shows Promising Therapeutic Implications and Determines Poor Clinical Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(2):347-356.

Cristóbal I, Torrejón B, Martínez-Useros J, et al. PP2A regulates signaling through hormonal receptors in breast cancer with important therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017; 1868(2):435-438.

Cruz-Bustillo D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004; 96(1):48-59.

Dasgupta N, Kumar Thakur B, Ta A, et al. Caveolin-1 is transcribed from a hypermethylated promoter to mediate colonocyte differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res*. 2015; 334(2):323–336.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949–954.

Deng X, Cao Y, Liu Y, et al. Overexpression of Evi-1 Oncoprotein Represses TGF- β Signaling in Colorectal Cancer. *Mol Carcinog*. 2013; 52(4):255–264.

De Sousa E, Melo F, Wang X, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*. 2013; 19(5):614–618.

Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013; 369(11):1023–1034.

Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis*. 2011; 34(1):101-109.

Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1795(1):1-15.

Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, et al. Stemness Is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis. *Mol Cancer Res*. 2018; 16(3):554-563.

Evers EE, Zondag GC, Malliri A, et al. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer*. 2000; 36(10):1269-1274.

Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial on infusional fluorouracil, leucovorin, LOHP and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007; 25(13):1670-1676.

Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, et al. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003; 112(5):659-672.

Fan X, Matsui W, Khaki L, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res*. 2006; 66(15):7445–452.

Fang C, Wang FB, Li Y, et al. Down-regulation of miR-199b-5p is correlated with poor prognosis for breast cancer patients. *Biomed Pharmacother*. 2016; 84:1189–1193.

Fang C, Zhao Y, Guo B. MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2013; 114(7):1457-1463.

Farrell AS, Allen-Petersen B, Daniel CJ, et al. Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*. 2014; 12(6):924-939.

Favreau AJ, McGlauflin RE, Duarte CW, et al. miR-199b, a novel tumor suppressor miR in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Exp Hematol Oncol*. 2016; 5:4.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5):759-767.

Fellner T, Lackner DH, Hombauer H, et al. A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo. *Genes Dev*. 2003; 17(17):2138-2150.

Feng Y, Li X, Zhou W, et al. Regulation of SET gene expression by NFκB. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(6):4477-4485.

Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Results from the BICC-C study. *J Clin Oncol*. 2007; 25(30):4779–4786.

Fukukawa C, Shima H, Tanuma N, et al. Up-regulation of I-2 PP2A / SET gene expression in rat primary hepatomas and regenerating livers. *Cancer Lett*. 2000; 161(1):89-95.

Garzia L, Andolgo I, Cusanelli E, et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One*. 2009; 4(3):e4998.

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007; 25(12):1539-1544.

Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much? *J Clin Oncol*. 2004; 22(10):1797–1806.

Gonzalez E, Nagiel A, Lin AJ, et al. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004; 279(39): 40659-40669.

Gopinathan L, Ratnacaram CK, Kaldis P. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. *Results Probl Cell Differ*. 2011; 53:365-389.

Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, et al. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2018; 378(13):1177-1188.

Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013; 381(9863):303-312.

Groves MR, Hanlon N, Turowski P, et al. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*. 1999; 96(1):99-110.

Ha TK, Her NG, Lee MG, et al. Caveolin-1 increases aerobic glycolysis in colorectal cancers by stimulating HMGA1-mediated GLUT3 transcription. *Cancer Res*. 2012; 72(16):4097-4109.

Han F, Zhu HG. Over-expression of caveolin-1 inhibits proliferation and invasion of pancreatic carcinoma cells in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2009; 31(10):732-737.

Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, et al. Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2007; 110(5):980-988.

Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15(10):1065-1075.

Hofheinz RD, Wenz F, Post S, et al. Chemoradiotherapy with capecitabine versus fluorouracil for locally advanced rectal cancer: A randomised, multicentre, noninferiority, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(6):579-88.

Huang YH, Chu PY, Chen JL, et al. SET Overexpression is Associated with Worse Recurrence-Free Survival in Patients with Primary Breast Cancer Receiving Adjuvant Tamoxifen Treatment. *J Clin Med*. 2018; 7(9).pii:E245.

Hung MH, Chen KF. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21(7):685-694.

Hung MH, Chen YL, Chu PY, et al. Upregulation of the oncoprotein SET determines poor clinical outcomes in hepatocellular carcinoma and shows therapeutic potential. *Oncogene*. 2016; 35(37):4891-4902.

Hung MH, Wang CY, Chen YL, et al. SET antagonist enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by reactivating protein phosphatase 2A. *Oncotarget*. 2016; 7(1):638-655.

Ichijo T, Chrousos GP, Kino T. Activated glucocorticoid receptor interacts with the INHAT component SET/TAF-Ibeta and releases it from a glucocorticoid-responsive gene promoter, relieving repression: implications for the pathogenesis of glucocorticoid resistance in acute undifferentiated leukemia with Set-Can translocation. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 283(1-2):19-31.

Jancík S, Drábek J, Radzioch D, et al. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:150960.

Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(25):9157-9162.

Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*. 2001; 353(Pt 3):417-439.

Janssens V, Longin S, Goris J. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci*. 2008; 33(3):133-121.

Joshi D, Chandrakala S, Korgaonkar S, et al. Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients. *Gene*. 2014; 542(2):109-112.

Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gac Med Mex*. 2014; 150(2):154-164.

Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*. 2007; 130(1):51-62.

- Kajitani K, Kato K, Nagata K. Histone H1 chaperone activity of TAF-I is regulated by its subtype-dependent intramolecular interaction. *Genes Cells*. 2017; 22(4):334-347.
- Kalousi A, Hoffbeck AS, Selemenaki PN, et al. The nuclear oncogene SET controls DNA repair by KAP1 and HP1 retention to chromatin. *Cell Rep*. 2015; 11(1):149-163.
- Kang DH. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues*. 2002; 13(4):540-549.
- Kannan A, Krishnan A, Ali M, et al. Caveolin-1 promotes gastric cancer progression by up-regulating epithelial to mesenchymal transition by crosstalk of signalling mechanisms under hypoxic condition. *Eur J Cancer*. 2014; 50(1):204-215.
- Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol*. 2014; 93(1-2):76-81.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359(17):1757–1765.
- Karetsou Z, Emmanouilidou A, Sanidas I, et al. Identification of distinct SET/TAF-I β domains required for core histone binding and quantitative characterization of the interaction. *BMC Biochem*. 2009; 10:10.
- Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Role of template activating factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J Cell Sci*. 2001; 124(Pt 19):3254-3265.
- Kato K, Miyaji-Yagamuchi M, Okuwaki M, et al. Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(3):705-715.
- Kim KB, Kim DW, Park JW, et al. Inhibition of Ku70 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β regulates Ku70-mediated DNA damage response. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(14):2731-2745.
- Kim JY, Lee KS, Seol JE, et al. Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β represses p53 activity. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(1):75-87.
- Kirstein MM, Lange A, Prenzler A, et al. Targeted Therapies in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Assessment of Currently Available Data. *Oncologist* 2014; 19(11):1156–1168.

Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, et al. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* 2012; 13(6):e249-258.

Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. *Cancer Sci.* 2017; 108(8):1681-1692.

Kuipers E, Grady W, Lieberman D, et al. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015; 1: 15065.

Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow up. *Ann Oncol.* 2010; Suppl 5:v70-77.

Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16(5):281–298.

Leopoldino AM, Squarize CH, Garcia CB, et al. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. *Oral Oncol.* 2012; 48(11):1106-1113.

Li L, Ren CH, Tahir SA, et al. Caveolin-1 Maintains Activated Akt in Prostate Cancer Cells through Scaffolding Domain Binding Site Interaction with and Inhibition of Serine/Threonine Protein Phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(24):9389-9404.

Li X, Bai H, Zhang Z, et al. The Up-Regulation of miR-199b-5p in Erythroid Differentiation Is Associated with GATA-1 and NF-E2. *Mol Cells.* 2014; 37(3):213–219.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(8):3992–3995.

Lin DH, Yue P, Pan C, et al. MicroRNA 802 stimulates ROMK channels by suppressing caveolin-1. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(6):1087–1098.

Lin SY, Yeh KT, Chen WT, et al. Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2004; 24(3a):1645–1650.

Liu H, Gu Y, Wang H, et al. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(17):14913-14925.

Liu MX, Siu MKY, Liu SS, et al. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014; 5(4):944-958.

Lobos-González L, Aguilar L, Diaz J, et al. E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013; 26(4):555-570.

Loven MA, Muster N, Yates JR, et al. A novel estrogen receptor alpha-associated protein, template-activating factor Ibeta, inhibits acetylation and transactivation. *Mol Endocrinol*. 2003; 17(1):67-78.

Luanpitpong S, Wang L, Stueckle TA, et al. Caveolin-1 regulates lung cancer stem-like cell induction and p53 inactivation in carbon nanotube-driven tumorigenesis. *Oncotarget*. 2014; 5(11):3541-3554.

Lucas CM, Scott LJ, Carmell N, et al. CIP2A- and SETBP1-mediated PP2A inhibition reveals AKT S473 phosphorylation to be a new biomarker in AML. *Blood Adv*. 2018; 2(9):964–968.

Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: Prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*. 2008; 111(11):4329–4337.

Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013; 45(8):942–946.

Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6):459-465.

Masi G, Salvatore L, Boni L, et al. Continuation or reintroduction of bevacizumab beyond progression to first-line therapy in metastatic colorectal cancer: Final results of the randomized BEBYP trial. *Ann Oncol*. 2015; 26(4):724–730.

Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, et al. Randomized Trial of TAS-102 for Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372(20):1909–1919.

Mehnert JM, Kluger HM. Diver mutations in melanoma: lessons learned from bench-to-bedside studies. *Curr Oncol Rep.* 2012; 14(5):449-457.

Miyaji-Yamaguchi M, Okuwaki M, Nagata K. Coiled-coil structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity. *J Mol Biol.* 1999; 290(2):547-557.

Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66(4):271-289.

Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24(5):186-191.

Mody HR, Hung SW, Naidu K, et al. SET contributes to the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(40):67966-67979.

Mukhopadhyay A, Tabanor K, Chaguturu R, et al. Targeting inhibitor 2 of protein phosphatase 2A as a therapeutic strategy for prostate cancer treatment. *Cancer Biol Ther.* 2013; 14(10):962-972.

Muto S, Senda M, Akai Y, et al. Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(11):4285-4290.

Nagata K, Saito S, Okuwaki M, et al. Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res.* 1998; 240(2):274-281.

Nanjundan M, Nakayama Y, Cheng K, et al. Amplification of MDS1/EVI1 and EVI1, located in the 3q26.2 amplicon, is associated with favorable patient prognosis in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(7):3074-3084.

Network TCGA, Muzny DM, Bainbridge MN, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407):330-337.

Neviani P, Santhanam R, Trotta R, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell.* 2005; 8(5):355-368.

Ng KT, Man K, Ho JW, et al. Marked suppression of tumor growth by FTY720 in a rat liver tumor model: the significance of down-regulation of cell survival Akt pathway. *Int J Oncol.* 2007; 30(2):375-380.

- Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2011; 38(1):209–217.
- Oaks J, Ogretmen B. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front Oncol.* 2015; 4:338.
- Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. *Gastroenterology.* 2015; 149(5):1204–1225e12.
- Omar HA, Chou CC, Berman-Booty LD, et al. Antitumor effects of OSU-2S, a non-immunosuppressive analogue of FTY720, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011; 53(6):1943-1958.
- Oxford G, Theodorescu D. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett.* 2003; 189(2):117-128.
- Park YJ, Luger K. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(5):1248-1253.
- Patel JB, Appaiah HN, Burnett RM, et al. Control of EVI-1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR-22. *Oncogene.* 2011; 30(11):1290-1301.
- Peng Y, Li C, Luo DC, et al. Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules.* 2014; 19(8):11586–11599.
- Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2013; 45(1):18-24.
- Pippa R, Domínguez A, Malumbres R, et al. MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A activation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017; 8(33):53989-54003.
- Puccini A, Berger MD, Naseem M, et al. Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2017; 1686(2):439-448.
- Qiu M, Liu L, Chen L, et al. MicroRNA-183 plays as oncogenes by increasing cell proliferation, migration and invasion via targeting protein phosphatase 2A in renal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452(1):163-169.

Rincón R, Cristóbal I, Zazo S, et al. PP2A inhibition determines por outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget*. 2015; 6(6):4299-42314.

Rosa R, Marciano R, Malapelle U, et al. Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(1):138-147.

Rossini D, Santini D, Cremolini C, et al. Rechallenge with cetuximab + irinotecan in 3rd-line in RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC) patients with acquired resistance to 1st-line cetuximab + irinotecan: The phase II CRICKET study by GONO. *Ann Oncol*. 2017; 28:Suppl 3.

Rowland A, Dias MM, Wiese MD, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888-1894.

Ruan H, Li X, Yang H, et al. Enhanced expression of caveolin-1 possesses diagnostic and prognostic value and promotes cell migration, invasion and sunitinib resistance in the clear cell renal cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2017; 358(2):269-278.

Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumor suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med*. 2013; 5(1):105-121.

Saito S, Miyaji-Yamaguchi M, Shimoyama T, et al. Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 259(2):471-475.

Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, et al. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2017; 116(8):1077-1087.

Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008; 26(12):2013-2019.

Sanabria MC, Umaña A, Serrano ML, et al. Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *REV COLOMB CANCEROL*. 2012; 16(3):170-181.

- Saxena S, Srinivas V, Deb P, et al. A study of BRAF mutation in colorectal carcinoma in Indian population. *J Cancer Res Ther*. 2018; 14(6):1403-1406.
- Schwencke C, Braun-Dullaeus RC, Wunderlich C, et al. Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: implications for human disease. *Cardiovasc Res*. 2006; 70(1):42–49.
- Seo SB, McNamara P, Heo S, et al. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell*. 2001; 104(1):119-130.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1):27–36.
- Shen Z, Wang B, Jiang K, et al. Downregulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget*. 2016; 7(23):35092–35105.
- Shlomain G, Zelenko Z, Antoniou IM, et al. OP449 inhibits breast cancer growth without adverse metabolic effects. *Endocr Relat Cancer*. 2017; 24(10):519-529.
- Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(4):1168-1176.
- Sirma Ekmekci S, G Ekmekci C, Kandilci A, et al. SET oncogene is upregulated in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Tumori*. 2012; 98(2):252-256.
- Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(14):2311-2309.
- Sousa LO, Sobral LM, Matsumoto CS, et al. Lymph node or perineural invasion is associated with low miR-15a, miR-34c and miR-199b levels in head and neck squamous cell carcinoma. *BBA Clin*. 2016; 6:159–164.
- Stevens SJC, van der Schoot V, Leduc MS, et al. De novo mutations in the SET nuclear proto-oncogene, encoding a component of the inhibitor of histone acetyltransferases (INHAT) complex in patients with nonsyndromic intellectual disability. *Hum Mutat*. 2018; 39(7):1014-1023.

Switzer CH, Cheng RYS, Vitek TM, et al. Targeting SET/I2PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene*. 2011; 30(22):2504-2513.

Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blind. *Lancet Oncol*. 2015; 16(5):499–508.

Tamas K, Walenkamp AM, de Vries EG, et al. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev*. 2015; 41(8):671-679.

ten Klooster JP, Leeuwen I, Scheres N, et al. Rac-1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO*. 2007; 26(2):336-345.

Thol F, Suchanek KJ, Koenecke C, et al. SETBP1 mutation analysis in 944 patients with MDS and AML. *Leukemia*. 2013; 27(10):2072-2075.

Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, et al. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(1):118–123.

Tournigand C, André T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004; 22(2):229–237.

Trimmer C, Bonuccelli G, Katiyar S, et al. Cav1 suppresses tumor growth and metastasis in a murine model of cutaneous SCC through modulation of MAPK/AP-1 activation. *Am J Pathol*. 2013; 182(3):992-1004.

Valeri N, Vannini I, Fanini F, et al. Epigenetics, miRs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mamm Genome*. 2009; 20(9-10):573–80.

Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27(8):1386-1422.

Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25(Suppl 3): iii1–iii9.

- Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011; 29(15):2011–2019.
- Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol*. 2012; 30(28):3499–3506.
- Van Gijn W, Marijnen CAM, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(6):575–582.
- Veeriah S, Brennan C, Meng S, et al. The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. *PNAS*. 2009; 106(23):9435-9440.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013; 339(6127):1546–1558.
- von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, et al. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3'half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol*. 1992; 12(8):3346-3355.
- Wang C, Song B, Song W, et al. Underexpressed microRNA-199b-5p targets Hypoxia-Inducible Factor-1alpha in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26(11):1630-1637.
- Wang J, Zhou F, Yin L, et al. MicroRNA-199b targets the regulation of ZEB1 expression to inhibit cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*. 2017; 16(4):5007-5014.
- Wei Y, Maximov V, Morrissy SA, et al. p53 Function is Compromised by Inhibitor 2 of Phosphatase 2A in Sonic Hedgehog Medulloblastoma. *Mol Cancer Res*. 2018; 17(1):186-198.
- Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008; 14(4):152-160.

Whang YE, Wu X, Suzuki H, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *PNAS*. 1998; 95(9):5246-5250.

Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, et al. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol*. 2001; 159(5):1635-1643.

Wieser R. The oncogene and developmental regulator EVI1: expression, biochemical properties and biological functions. *Gene*. 2007; 396(2):346-357.

Yang SF, Yang JY, Huang CH, et al. Increased caveolin-1 expression associated with prolonged overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *Pathology*. 2010; 42(5):438-445.

Yeo S, Kim D, Kim T, et al. Pathologic complete response of primary tumor following preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: long-terms outcomes and prognostic significance of pathological nodal status (KROG 09-01). *Ann Surg*. 2010; 252(6):998-1004.

Yoon , Cho SJ, Chang KK, et al. Role of Rac-1 Pathway in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem-like Cell Phenotypes in Gastric Adenocarcinoma. *Mol Cancer Res*. 2017; 15(8):1106-1116.

Yuan X, Zhang T, Zheng X, et al. Overexpression of SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human gastric cancer. *Oncol Rep*. 2017; 38(3):1733-1741.

Yuasa H, Oike Y, Iwama A, et al. Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *EMBO J*. 2005; 24(11):1976-1987.

Zeng H, Zhang Z, Dai X, et al. Increased Expression of microRNA-199b-5p Associates with Poor Prognosis Through Promoting Cell Proliferation, Invasion and Migration Abilities of Human Osteosarcoma. *Pathol Oncol Res*. 2016; 22(2):253-260.

Zhang B, Wang J, Wang X, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2014; 513(7518):382-387.

Zhang J, Zhang K, Zhou L, et al. Expression and potential correlation among Forkhead box protein M1, Caveolin-1 and E-cadherin in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2016; 12(4):2381–2388.

Zhao H, Zhao H, Zhang Y, et al. MicroRNA-199b promotes cell proliferation and invasion in Wilms' tumour by directly targeting Runt-related transcription factor 3. *Mol Med Rep.* 2018; 18(2):1812-1819.

Zheng T, Meng X, Wang J, et al. PTEN- and p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by FTY720 in gastric cancer cells and nude mice. *J Cell Biochem.* 2010; 111(1):218-228.

Zonta F, Pagano MA, Trentin L, et al. Lyn sustains oncogenic signaling in chronic lymphocytic leukemia by strengthening SET-mediated inhibition of PP2A. *Blood.* 2015; 125(24):3747-3755.